

UHH-FC
Biotecnología
A 658P
C. 1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“Efecto de la mutación H63D de HFE, la Proteína de la Hemocromatosis Hereditaria, sobre la interacción HFE/TFR1: Estudio Bioinformático”

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

RAÚL RENE ARAYA SECCHI

Director de Memoria de Título
Dr. Marco Tulio Nuñez González

A blue ink signature of Marco Tulio Nuñez González written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Osvaldo Alvarez Araya
Presidente Comisión

A blue ink signature of Osvaldo Alvarez Araya written over a horizontal line.

Dr. Tomás Pérez-Acle



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**Efecto de la mutación H63D de HFE, la
Proteína de la Hemocromatosis
Hereditaria, sobre la interacción
HFE/TfR1: Estudio Bioinformático**

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

Raúl Rene Araya Secchi

**Mayo 2005
Santiago-Chile**

Director de Tesis: Dr. Marco Tulio Nuñez



ÍNDICE DE MATERIAS



	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis de Trabajo	12
1.2 Objetivo General	13
1.3 Objetivos Específicos	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Descripción Gral. Del Hardware utilizado	14
2.2 Descripción Gral. Del Software utilizado	14
2.3 Descripción de los métodos computacionales y de cálculo utilizados	15
2.3.1 Estructuras 3D de HFE, Tfr1 y el complejo HFE/Tfr1: Obtención, Refinamiento, Mutación.	17
2.3.2 Procedimiento utilizado para simular el cambio de pH de 7,5 a 6,0	18
2.3.3 a) Descripción del método simplificado de calculo de energía libre electroestática "Simplified Electrostatics" del programa MOLARIS	18
2.3.3 b) Descripción del método de calculo de potenciales electroestáticos mediante la resolución lineal de la ecuación de Poisson-Boltzmann (FDPB) del programa DELPHI	21
2.3.3 c) Descripción del método de calculo de energía electroestática libre de unión mediante el sistema semi-macroscópico "Protein dipoles Langevin Dipoles" (PDL/D/S) del programa MOLARIS	23
3. RESULTADOS	28
3.1 Mapas de potencial electroestático obtenidos mediante FDPB(DELPHI)	28
3.2 Resultados obtenidos para el cálculo del cambio en la energía libre electroestática de unión (HFE/Tfr1) mediante SEM	29
3.3 Resultados obtenidos para el cálculo del cambio en la energía libre electroestática de unión (HFE/Tfr1) mediante FDPB (DELPHI)	31
3.4 Resultados obtenidos para el cálculo del cambio en la energía libre electroestática de unión (HFE/Tfr1) mediante PDL/D/S	33
3.5 Resumen y Comparación de los Resultados	34
4. DISCUSIÓN	37
5. CONCLUSIONES	45
6. BIBLIOGRAFÍA	47

ABREVIATURAS

ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
Asp	Aspartato
ADN	Acido desoxi Ribonucleico
β2m	β 2-microglobulina
DMT1	Transportador de metales divalentes 1
ϵ	Constante dieléctrica
ϵ_{in}	Constante dieléctrica de la proteína
ϵ_w	Constante dieléctrica del agua
Fe	Hierro
FDPB	Finite Diference Poisson Boltzmann (método de resolución de la ecuacion de Poisson Boltzmann implementado en el programa DELPHI)
Fn	Ferritina
HFE	Proteína de la Hemocromatosis Hereditaria
HFE-Wt	Forma silvestre de la proteína de la Hemocromatosis Hereditaria
HFE-H63D	Proteína de la Hemocromatosis Hereditaria que contiene la mutacion H63D
HH	Hemocromatosis Hereditaria
His	Histidina
HLA	Human Leucocyte Antigen
HFE/TfR1	Complejo entre la proteína de la hemocromatosis hereditaria y el receptor para transferrina (1)
IREG1	Exportador de Fe (desde citoplasma hacia medio externo)
IRE	Elemento de respuesta a Hierro (Iron Response Element)
IRP	Proteína reguladora del Hierro (Iron Regulatory Protein)
LIP	Contenido de Hierro labil (Labile Iron Pool)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad

PDB	Protein Data Bank
PDB-ID	Identidad de una proteína dentro del Protein Data Bank
PDL/D/S	Protein Dipoles Langevin Dipoles Semimacriscopic Method
SEM	Simplified Electrostatic Method (Método de calculo de contribuciones electroestaticas del programa MOLARIS)
Tf	Transferrina
TfR1	Receptor nº1 para transferrina
Tf-TfR1	Complejo entre transferrina y su receptor 1
Fe-TF	Transferrina Férrica
apo-Tf	Transferrina libre de Hierro

La Hemocromatosis Hereditaria (HH) es un desorden del metabolismo del hierro caracterizado por un aumento en la absorción intestinal, acumulación y progresiva sobrecarga de Fe. Dos mutaciones en la proteína HFE, H63D y C282Y, dan cuenta de aproximadamente el 90% de los casos de HH. Observaciones recientes de Arredondo y Núñez (2003-2004) utilizando como modelo las células intestinales humanas Caco2, han indicado que la sobre-expresión del mutante H63D no causa la inhibición de la captación apical de Fe observada al sobre-expresar HFE-wt. Experimentos de biotinylación diferencial mostraron además, que la sobre-expresión de HFE-wt producía un aumento de su presencia en la zona apical de la célula intestinal comparado con el control que sólo expresa HFE-wt endógeno. Sin embargo, en células que sobre-expresaban el mutante H63D no se observó ninguna diferencia en la distribución de HFE, respecto del control. Mediante técnicas bioinformáticas se busca en este trabajo una explicación a tales fenómenos, tomando como base, el posible efecto de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1, la única interacción hasta ahora descrita para HFE. Los resultados obtenidos evidencian un aumento de la estabilidad del complejo HFE/TfR1 cuando HFE lleva la mutación H63D, respecto del Wt. Este aumento en la estabilidad del complejo HFE/TfR1 es más notorio a pH 6,0, el cual, corresponde al pH endosomal, lo que nos permite inferir que la mutación H63D de HFE disminuye la tasa de disociación del complejo HFE/TfR1, haciendo que una proporción HFE sea reciclado junto con TfR1 hacia la membrana basolateral y por lo tanto incapaz de traficar hacia la membrana apical donde cumpliría su función inhibitoria de la captación apical de Fe.

El Hierro (Fe) es considerado el elemento traza más importante para la vida. Está involucrado en una gran variedad de procesos biológicos como transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y síntesis de ADN. Sin embargo, el Fe es considerado además como un elemento potencialmente tóxico puesto que produce un aumento en el stress oxidativo (por medio de la reacción de Fenton) siendo dañino para las células en altas concentraciones. Es por esto que los mecanismos de regulación de la homeostasis y metabolismo de Fe son complejos y han comenzado a ser desvelados recientemente.

En condiciones normales, el 70% del Fe inorgánico se encuentra en la hemoglobina o depositado en Ferritina o Hemosiderina (en el sistema reticuloendotelial y células del parénquima hepático). El resto se encuentra en diversas proteínas o circulando unido a Transferrina (Tf) (INACG, 1997).

Las células pueden obtener el Fe circulante de dos formas; la más común y general es mediante la internalización de Fe-Tf a través de la endocitosis del complejo formado por la Fe-Tf y su receptor, el receptor 1 para Transferrina (TfR1). Este complejo es internalizado hasta un sistema endosomal que al ser acidificado (de pH 7,5 a 6,0) permite la liberación del Fe de la Transferrina que luego es transportado hacia el citoplasma. El complejo apoTf-TfR1 por su parte, es reciclado hacia la superficie celular donde el pH neutro del medio permite la liberación de la apoTf (Aisen & Brown, 1980; Weinberg, 1989).

El otro mecanismo, que sólo se activa bajo circunstancias especiales, es el transporte directo de Fe desde la membrana de manera independiente de Tf. Este proceso se realiza mediante el transportador de membrana DMT1 (Gunshin et al., 1997). La mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo del Fe son a su vez reguladas de manera post-transcripcional mediante el sistema IRE/IRP (Haile et al,

1992; Emery-Goodman et al., 1993; Theil, E. 1993; Dix et al., 1993). Dicho sistema consiste en que el ARNm de ciertas proteínas como Fn, TfR1, DMT1 (IRE) poseen un “elemento de respuesta al Fe” o “iron responsive element” (IRE) ubicado en la región 5' o 3' no codificante del transcrito. A estos sitios IRE se les une la proteína IRP (iron regulatory protein) cuya actividad de unión a ARNm está regulada inversamente por la concentración de Fe intracelular, es decir, a menor concentración de Fe mayor actividad de unión a ARNm y viceversa. Si el transcrito en cuestión tiene su fragmento IRE en la región 5' no codificante, como pasa por ejemplo para Fn y la 5-amino-levulinico Sintetasa Eritroide, la unión de IRP inhibe el proceso de traducción de dichas proteínas (es el caso de proteínas que deben disminuir al disminuir el Fe). Si el fragmento IRE está en la región 3' no codificante del transcrito, la unión de IRP estabilizará el ARNm aumentando su expresión. Es el caso de TfR1 y DMT1 dado que se requieren mayores cantidades de dichas proteínas en ausencia de Fe (Samaniego et al., 1994; Gray & Hentze, 1994; Groossen et al., 1990; Leibold & Guo, 1992; Kühn & Hentze, 1992; Haile et al., 1992).

Por sobre todos los sistemas de regulación del Fe corporal, el proceso clave y crítico del metabolismo del Fe es su absorción a nivel intestinal desde la dieta. Dicha absorción es regulada por los niveles corporales de Fe. La absorción será bloqueada (bloqueo mucosal) o aumentada, dependiendo de la cantidad de Fe existente en el sistema. Se ha determinado que existen dos sitios de regulación de la absorción intestinal de Fe: 1) Regulación en la etapa de captación e incorporación y 2) Regulación en la etapa de transferencia del Fe hacia el medio basolateral (transporte) (Brown et al., 1958; Flanagan, 1989).

Para detectar los niveles de Fe del cuerpo, la célula intestinal es capaz de realizar endocitosis de Fe-Tf mediante el ciclo endocítico del receptor de Transferrina (TfR1) (Weinberg, 1989; Crichton & Ward, 1991; Núñez et al., 1996) y mediante un efector proveniente del hígado llamado Hefcidina (Nemeth E.

et al., 2004; Nicolas, G. et al., 2002; Fleming RE. 2001). Estos a su vez regularan la captación (DMT1) y transferencia (IREG1) del Fe dietario. En las células intestinales que absorben Fe dietario, el ciclo Fe-Tf-TfR1 sólo se produce en la membrana basolateral puesto que TfR1 solo se expresa en dicha membrana. La fase de mayor regulación en el proceso de absorción intestinal de Fe es la captación o transporte de Fe desde el lumen intestinal hacia el citoplasma del enterocito. Dicho transporte está mediado por el transportador de metales divalentes DMT1 que es una proteína con 12 segmentos transmembrana que funciona como transportador activo acoplado a protones y es capaz de transportar metales como Cu^{+2} , Zn^{+2} y Cd^{+2} además de Fe (Gunshin et al., 1997). Se ha reportado que DMT1 no sólo se expresa en células intestinales, si no también en hígado, hipocampo, corteza y riñón (Trinder et al., 2000; Williams et al., 2000; Ferguson et al., 2001; Tchernitchko et al., 2002). Existen al menos dos variantes de empalme de DMT1; una que contiene el fragmento IRE y otra que no lo posee, siendo la primera la única regulada directamente por los niveles de Fe intracelular. DMT1 también ha sido localizado en endosomas tardíos y lisosomas, indicando que puede participar también en procesos de transporte del Fe que llega a los endosomas transportado mediante Tf-TfR1 hacia el citoplasma (Fleming et al., 1998-99; Gruenheid et al., 1999; Andrews et al., 1999).

Con todo lo anterior es posible hacerse una idea de lo complejo y finamente controlado que resulta el sistema de regulación de la absorción y metabolismo del Fe. Algunas de las aproximaciones a este sistema se han hecho en base al estudio de sus disfunciones, siendo una de las más ampliamente estudiadas la Hemocromatosis Hereditaria (HH).

La HH es un desorden autosómico recesivo del metabolismo del hierro ligado al sistema mayor de Histocompatibilidad (HLA/MHC clase I). Es uno de los desórdenes genéticos más comunes en la raza humana con una frecuencia de 1 a 2 individuos entre 400, observándose mayoritariamente en

descendientes de raza europea. La incidencia de HH es mayor que la sumatoria de la fibrosis quística, fenilcetonuria y distrofia muscular (Feder et al., 1996; Parkkila et al., 1997a). La HH consiste en una falla en la regulación de la absorción intestinal de Fe, produciendo un aumento en la saturación de Tf y la posterior acumulación y depósito progresivo de Fe en células parenquimáticas de algunos órganos (corazón, hígado, páncreas, riñones, etc.) causando en ellos toxicidad y disfunción celular lo que a largo plazo puede generar: diabetes, cirrosis hepática, hipogonadismo y fallas cardíacas. Esta enfermedad, al ser acumulativa, no presenta síntomas característicos si no que aparece como una serie de disfunciones orgánicas. Debido a su alta penetrancia e incidencia, la HH ha generado gran interés científico prolongándose por años la búsqueda de los genes involucrados en esta patología, llegando incluso a pensarse que existía una posible relación entre la expresión anormal de Fn y TfR1 que llevaran a la acumulación de Fe en los individuos afectados. (Santos et al., 1996; Felitti & Beutler, 1999; Fleming & Sly, 2002)

En 1996 Feder y cols. identificaron un gen que aparece mutado en más del 80% de los pacientes de HH en el brazo corto del cromosoma 6 y que codifica la proteína HFE. Curiosamente, esta proteína resultó poseer una estructura tridimensional similar a la de proteínas MHC de clase I, relacionadas con funciones inmunológicas. Los seis primeros exones del gen HFE codifican un péptido señal de 22 aminoácidos, tres dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (residuos del 23 al 293) un dominio transmembrana (residuos del 294 al 316) y un pequeño dominio citoplasmático (residuos del 317 al 343) codificando una proteína de 343 aminoácidos (ver Fig.1). La posterior caracterización y cristalización de la proteína permitió describir su morfología en más detalle y comprobar su parecido estructural con proteínas MHC clase I. Entre sus principales características destaca el hecho que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ forman un superdominio que incluye dos alfa hélices antiparalelas y un “canastillo” de hojas β formando un “bolsillo” análogo al que poseen las proteínas de MHC clase I pero demasiado angosto

para poder alojar un péptido lo que sugiere que la función de HFE no sería análoga a la función de las proteínas MHC clase I a pesar de su similitud estructural (Lebrón et al., 1998). (ver Fig.1)

Junto con el descubrimiento del gen de HFE en 1996 (Feder et al., 1996) se describió también la primera mutación en éste, que podría ser responsable de la HH. Dicha mutación corresponde al cambio de una base en el exón 4 y consiste en cambiar la G (guanina) 845 por una A (adenina) del marco de lectura abierto, lo que produce el cambio de la cisteína 282 por una tirosina (C282Y). Dicha mutación involucra a un aminoácido altamente conservado y elimina un puente SS intramolecular, crucial para el plegamiento correcto de HFE. Esta situación implica que la proteína mutada no puede interactuar con la chaperona $\beta 2m$ en el retículo endoplasmico y no puede traficar hacia la superficie celular generando una proteína no funcional que es retenida en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, siendo degradada rápidamente (Waheed et al., 1997; Parkila et al.,1997b; Feder et al.,1997; Gross et al., 1998; Waheed et al.,1999).

Al describirse esta mutación se pudo comprobar la relación de HFE con la HH pues se observó que el 85% de los pacientes de HH eran homocigotos para C282Y. Dichos pacientes presentan una reducida expresión en la superficie celular de la proteína mutada (Parkilia et al., 2000), lo que confirmó la importancia de la asociación de HFE con $\beta 2m$ cuya importancia funcional fue demostrada mediante la obtención de ratones *knock-out* de $\beta 2m$ ($\beta 2m^{-/-}$) (Santos et al., 1996; Levy et al., 1999) y HFE los que presentaron una sobrecarga de Fe similar a la observada en pacientes de HH.

Una segunda mutación en HFE, más común que C282Y, pero que produce una versión menos severa de la enfermedad, corresponde al cambio de la C(citosina) 187 por G(guanina) en el segundo exón, de manera que la His 63 es cambiada a un Asp en la secuencia aminoacídica correspondiente al dominio $\alpha 1$

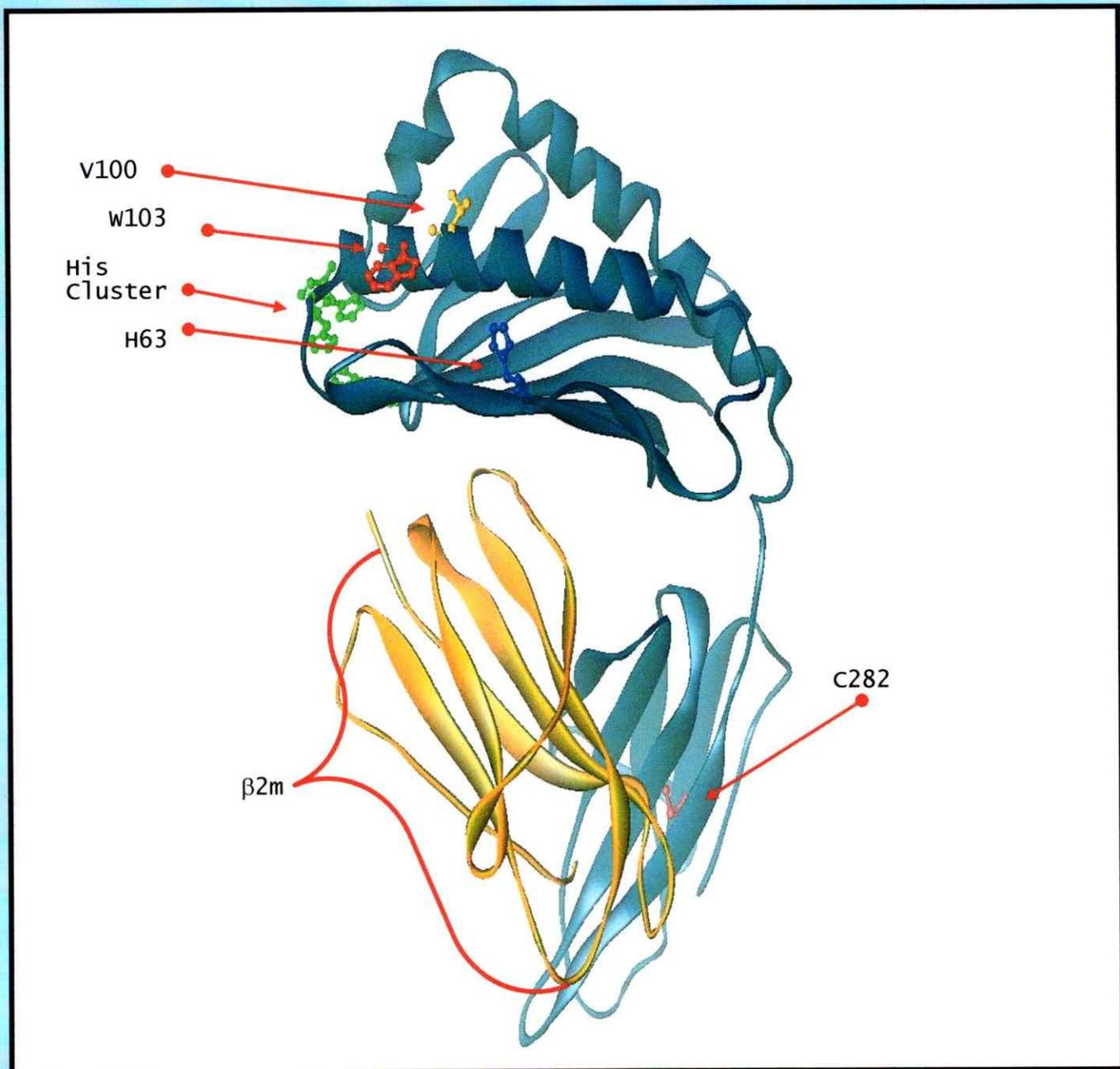


Fig1. Representación esquemática de la estructura de HFE.

Las α -hélices superiores corresponden a las α -hélices 1 y 2 del súper dominio α 1-2. En estas α -hélices se encuentra la región de interfase con TfR1. En Rojo en la parte inferior, correspondiente al dominio α 3 se observa el puente disulfuro crítico para el plegamiento de HFE y su interacción con β 2m, el cual es eliminado cuando esta presente la mutación C282Y principal responsable de la HH. Además se indican dos de los residuos más relevantes para la interacción HFE/TfR1 (V100, W103.), el residuo His 63 que es cambiado a Asp en la otra mutación responsable de HH y el singular cluster de 4 His que aun no tiene función conocida.

de HFE. Esta mutación podría afectar la interacción HFE/TfR1 (que se explicará más adelante) debido a su posición en la proteína, sin embargo, su efecto es aun desconocido. (Waheed et al., 1997; Fleming & Sly, 2002)

A diferencia de la mutación C282Y la mutación H63D no complica el plegamiento normal de la proteína HFE y es destinada hacia la membrana plasmática de igual forma que HFE-wt. Otra diferencia entre ambas mutaciones es que a pesar de que la mutación H63D esta presente en un 15 a 40 % de la población caucásica, es muy poco frecuente como homocigoto. Por otra parte ocho de nueve pacientes heterocigotos para la mutación C282Y tienen la mutación H63D en el otro alelo (Beutler, 1998), sin embargo el riesgo de sobrecarga de Fe en los heterocigotos C282Y/H63D es 200 veces menor que en los pacientes homocigotos para C282Y.

Además de las mutaciones ya mencionadas se han descrito otras mutaciones en HFE en pacientes que presentan sobrecarga de Fe. Estas mutaciones incluyen, S65C, G93R, I105T (Barton et al., 1999; Mura et al., 1999) siendo la más común S65C. Se han descrito también dos mutaciones que producen un cambio en el marco de lectura (P160 Δ C y V68 Δ T) (Pointon et al., 2000), dos mutaciones sin sentido (Piperno et al., 2000) y una mutación en el sitio de splicing (Wallace et al., 1999).

La primera prueba de que HFE participa directamente en la homeostasis de Fe fue el descubrimiento de su interacción con TfR1 con una afinidad similar a Tf (ver Fig.2) (Bennet et al., 2000; Davies & Enns 2003). Estudios iniciales demostraron que esta interacción era dependiente del pH, permitiendo la asociación de HFE con TfR1 con alta afinidad a pH 7,5; correspondiente al pH en el medio extracelular y una elevada pérdida de afinidad a pH 6,0; correspondiente al pH de los compartimentos endosomales Tf positivos, lo que sugería su disociación en dichos compartimentos (Lebrón et al., 1998-1999; Roy &

Enns, 1999). Por otro lado estudios posteriores llevaron a pensar que HFE competía con Tf por la unión al receptor (TfR1) y que de esta manera podía regular la entrada de Fe transferrínico en las células. Sin embargo, dado que la constante de disociación del complejo HFE/TfR1 es del orden nanomolar (2-5 nM) y la concentración plasmática de Tf es de aproximadamente 35 μ M, es muy probable que Tf pueda saturar completamente a TfR1 aun en presencia de HFE (Lebrón et al., 1998; Feder et al., 1998). Entonces aunque sea cierto que HFE reduce la afinidad de TfR1 por Tf, dicho suceso es sólo aplicable a la situación de células no polarizadas que obtienen todo su Fe mediante el ciclo Tf/TfR1 (Roy & Enns, 1999). En este sentido otros estudios sugirieron que HFE regulaba el flujo (ciclo) transferrínico de Fe en células intestinales de manera de programar a los enterocitos inmaduros para que estos absorbieran la cantidad adecuada de Fe según las necesidades corporales, así en la HH, la disfunción de HFE produciría un mensaje de falta de Fe en el enterocito inmaduro de manera que éste absorbiera grandes de cantidades de Fe dietario al madurar (Roy & Enns, 2000).

Sin embargo, las investigaciones más recientes sobre la materia han sugerido que HFE no ejerce su función directamente sobre TfR1 y lo necesita sólo para ser endocitado hacia endosomas Tf positivos. Junto con lo anterior, la demostración de que HFE puede ejercer un rol regulatorio de la absorción de Fe independientemente de TfR1 y que posee funciones que difieren según el tipo celular donde sea estudiado (HT29, TRVb, Caco2, HeLa) (Davies & Enns, 2004; Carlson & Enns, 2004; Arredondo y Núñez 2001), han reforzando la idea de que HFE es una proteína poli-funcional y su papel en la homeostasis de Fe es dinámico y realizado en endosomas interactuando con otras proteínas y no necesariamente en la membrana basolateral alterando la interacción Tf/TfR1 o programando al enterocito inmaduro (Ver Review de Pietrangello, 2004)

Pero ¿Cuál es la función de HFE en las células intestinales que absorben el Fe dietario, si no sucede en la membrana basolateral regulando el ciclo de la Tf? Esta última pregunta ha sido el motor de una serie de experimentos relacionados con HFE y la homeostasis de Fe realizados por nuestro grupo en el Laboratorio del Hierro y Biología del Envejecimiento. Dichos experimentos fueron realizados utilizando como modelo células polarizadas con similares características a las células intestinales que absorben Fe (Caco2), y mostraron que la sobre-expresión de HFE (Wt) produce una disminución drástica en la captación y transcitosis de Fe, junto con una disminución significativa del reservorio de hierro lábil (Labile Iron Pool o LIP). Como era de esperarse, debido a la disminución en la absorción de Fe y la baja del LIP, se observó un aumento en la actividad IRE/IRP, un aumento en la expresión de TfR1, una disminución en la expresión de Tf y un aumento en la expresión de DMT1, el transportador apical de Fe. Sin embargo, pese al aumento en la expresión de DMT1, se mantiene disminuida o reprimida la absorción de Fe, situación que nos llevó a pensar en una posible inhibición del transportador por parte de HFE (Arredondo M. & Núñez M.T. 2001). Al realizar los mismos experimentos descritos anteriormente pero esta vez sobre-expresando HFE-H63D en células polarizadas, para intentar observar el efecto de dicha mutación en la regulación de la absorción de Fe, los resultados obtenidos son muy similares a los controles, por lo que puede inferirse que sólo es posible observar el efecto del HFE endógeno, puesto que el sobre-expresado, (H63D) no es funcional (Arredondo M. & Núñez M.T. 2004 aun por publicar) (Ver Tabla 1).

	Células Caco2 /sobre-expresan	
	HFE-Wt	HFE-H63D
Fe-uptake	↓	≅ Control
Fe-transcitosis	↓	≅ Control
L.I.P	↓	≅ Control
DMT1	↑	≅ Control
TfR1	↑	≅ Control
Fn	↓	≅ Control

Tabla1. Resumen de los resultados obtenidos por Arredondo, et al., (2003-04) para las distintas variables de la homeostasis de Fe en células Caco2 que sobre-expresan HFE-Wt o HFE-H63D. En el caso de las células que sobre-expresan HFE-H63D el termino “≅Control” se utiliza para indicar que dichas células no presentaban diferencias respecto a los controles (células Caco2 sin transfectar, sólo con su HFE endógeno).

Con estas primeras evidencias, la mirada de nuestro grupo se ha centrado en la posible interacción inhibitoria entre HFE y el transportador apical DMT1. Para ahondar más en esta línea se han desarrollado una serie de experimentos que incluyen: 1) Inmunoprecipitación de HFE con DMT1, 2) ensayos de biotilación para observar posibles cambios en la distribución intracelular de HFE y/o TfR y/o DMT1. Entre estos experimentos, han sido los ensayos destinados a establecer cambios en la distribución apical/basolateral de DMT1 y HFE los que han reportado los resultados más interesantes.

En dichos ensayos se ha observado que al sobre-expresar HFE hay un aumento en la destinación apical de esta proteína que en condiciones controles es más bien basolateral, en cambio, al sobre-expresar HFE-H63D no hubo tal cambio, pese a que la cantidad de sobre-expresión era similar en ambos casos. En el caso de DMT1, éste aumentó su presencia en la zona basolateral al sobre-expresar HFE y HFE-H63D, en cambio TfR1 no sufre ningún tipo de modificación y permanece siempre casi 100% en el lado basolateral (ver Fig3.).

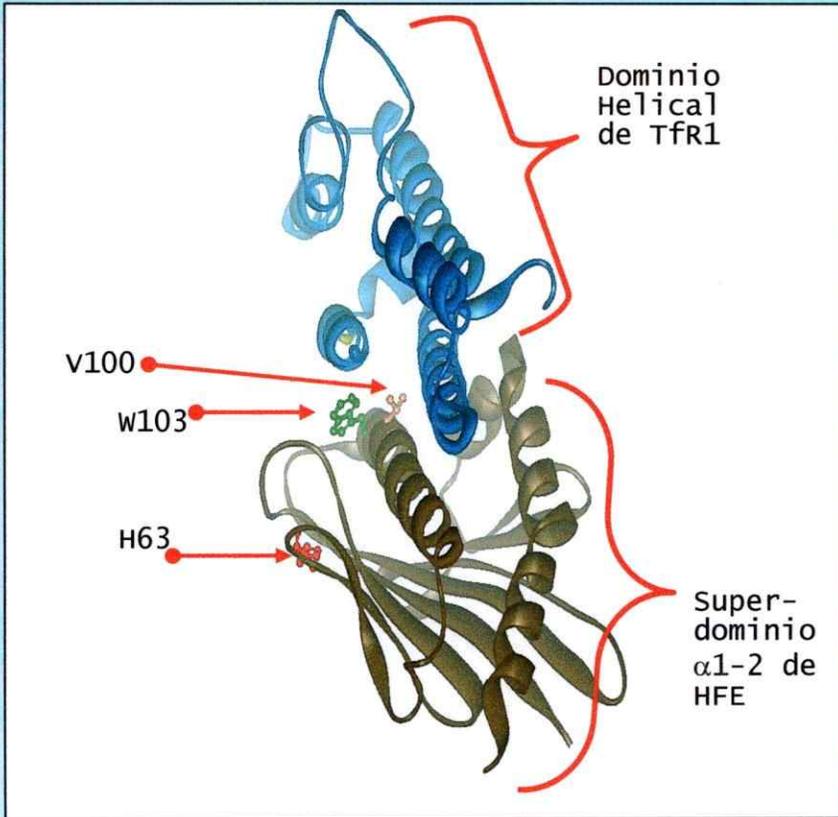


Fig2. Representación esquemática de la interacción HFE/TfR1.

Se observa el calce entre las hélices α 1 y α 2 de HFE y TfR1. Se destacan los aminoácidos más relevantes de HFE para la interacción, como son W103 y V100. Además se puede observar el residuo 63(His) que si bien no esta directamente en la zona de interacción esta en una posición tal que aun podría tener un efecto electroestático sobre esta. Para efectos de simplificación de la figura se elimino toda estructura de tFR1 que no corresponda al dominio helical participante en la interacción con HFE, del cual sólo se aprecia el súper dominio α 1-2.

Antibody	Basolateral			Apical		
	C	HFE	H63D	C	HFE	H63D
TfR	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]
DMT1	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]
HFE	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]
B2-M	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]	[band]

Fig. 3. Distribución Apical/Basolateral de HFE, DMT1, TfR1 y b2m en células Caco2 controles (C) y células Caco2 que sobre-expresan HFE-wt (HFE) o HFE-H63D (H63D). (Resultados de Arredondo et al 2004)

Se observa claramente como al aumentar la sobre-expresión de HFE-wt hay un aumento en su presencia Apical respecto del control, sin embargo, este aumento en la destinación apical no se observa en las células que sobre-expresan HFE-H63D, a pesar que el nivel de sobre-expresión es similar. Los resultados se ven apoyados además por el hecho de que los cambios de distribución observados para HFE (wt y H63D) se observan también para la b2m, la cual solo mantiene su expresión endógena. Junto con eso se observa que TfR1, una proteína basolateral aparece sólo en el lado basolateral, funcionando a manera de control.

Entonces, ¿Qué sucede con HFE que al ser sobre-expresado aparece en mayor cantidad en el lado apical respecto de los controles? ¿Qué sucede en el caso de HFE-H63D, que pese a estar sobre-expresado no aumenta su presencia en el lado apical? ¿Será acaso que HFE trafica hacia la zona apical como parte normal de su función y en el caso de la mutación H63D este es retenido en el endosoma o reciclado hacia la membrana basolateral?

Con todo esto en mente decidimos elegir la interacción HFE/TfR1 como posible candidata para regular el destino post-endosomal de HFE, puesto que como se mencionó, dicha interacción es el único mecanismo conocido por el cual HFE es capaz de ser endocitado (pues HFE no posee secuencia propia de endocitosis) y además porque evidencia reciente indicaría que la dependencia de la interacción HFE/TfR al pH no es absoluta ya que al unir a HFE una región de destinación a lisosoma (LAMP) pudieron observarse complejos de HFE/TfR1 en dichos compartimentos (Davies, et al. 2003). En Particular lo que nos interesa en este trabajo es observar si la mutación H63D de HFE tiene algún efecto en la interacción HFE/TfR1 que pudiera dar cuenta de las diferencias en la destinación apical de HFE y H63D al ser sobre-expresado.

Así, esta tesis se desarrolló bajo la premisa de describir el efecto de la mutación H63D en la interacción HFE/TfR1 mediante tres métodos bioinformáticos (*In-Silico*) utilizados con el fin de calcular la energía libre de unión entre ambas proteínas en busca de pruebas que permitieran explicar los cambios en la distribución apical/basolateral de HFE debido a la mutación H63D. Los tres métodos utilizados consideran principalmente las contribuciones electrostáticas de la interacción y los demás tipos de contribuciones a la energía libre de interacción, como por ejemplo contribuciones hidrofóbicas y entropías conformacionales no son calculados explícitamente o bien no son considerados. Sin embargo

debido al carácter ionizable de los aminoácidos involucrados en la mutación en estudio (His – Asp) es probable que el efecto de esta sobre la interacción HFE/TfR1 sea mayoritariamente de carácter electrostático, de manera que podría ser satisfactoriamente calculable o medible con los métodos utilizados.

Los resultados obtenidos a partir de los métodos de cálculo utilizados indican que la mutación H63D de HFE aumenta la estabilidad de la interacción HFE/TfR1, es decir, dicha mutación podría aumentar la afinidad de HFE por TfR1 en los endosomas (puesto que el aumento en la estabilidad es más notorio a pH 6,0 que corresponde al pH endosomal) haciendo menos disponible a HFE para ser transportado a otra región de la célula y/o cumplir su función. De este modo, nuestros resultados de modelamiento molecular nos entregan una explicación satisfactoria al hecho de que exista una disminución de la presencia de HFE en la región apical de células Caco2 al ser sobre-expresado HFE-H63D, comparado con la cantidad de HFE apical en células Caco2 al ser sobre-expresado HFE-Wt.

1.1 Hipótesis de Trabajo

La mutación His63Asp de HFE (HFE-H63D) modifica la interacción de HFE con el receptor 1 de transferrina (TfR1) en compartimentos endosomales, disminuyendo la disponibilidad de HFE para traficar a la membrana apical.

1.2 Objetivo General

Describir mediante técnicas bioinformáticas el efecto que la mutación H63D de HFE tiene sobre la interacción HFE-TfR1 de manera de obtener un modelo capaz de explicar los cambios en la distribución apical/basolateral de HFE-H63D, respecto de HFE-wt, reportados anteriormente por nuestro laboratorio.

1.3 Objetivos Específicos

- Descripción cualitativa de los cambios de la superficie electrostática de HFE y TfR1, ya sea por el cambio de pH de 7,5 a 6,0 y/o por la introducción de la mutación H63D de HFE utilizando el programa DELPHI con el fin de obtener mapas de la distribución de cargas en las diferentes condiciones.
- Cálculo de la energía libre de Gibbs de unión entre HFE y TfR tanto para HFE-Wt como para HFE-H63D a pH 7,5 y 6,0 utilizando tres aproximaciones computacionales, de manera de observar la existencia de cambios en la estabilidad de la interacción debido al cambio de pH y/o a la mutación H63D de HFE. El uso de más de un método de cálculo permitirá darle robustez a los resultados que se obtengan si estos siguen una misma tendencia. El cambio de pH nos permitirá verificar si nuestros sistemas de cálculo son capaces de predecir correctamente el efecto del pH sobre la interacción, los cuales han sido descritos *in-Vitro* por Lebrón et al., 1998-1999 y Roy & Enns, 1999.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. DESCRIPCION GENERAL DEL HARDWARE

Para el desarrollo de los cálculos y simulaciones realizadas en esta tesis se utilizaron dos plataformas computacionales:

- 1.) Silicon Graphics OCTANE R10000. Sistema Operativo IRIX 6.4
- 2.) PC Cluster 8 CPU Intel Pentium III. Sistema Operativo MANDRAKE-Linux

2.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SOFTWARE UTILIZADO

Nombre	Desarrollado por
INSIGHT II (Módulos: Biopolymer, DELPHI, Discover)	Accelrys Inc. San Diego, California. EE.UU.
MOLARIS (Módulos: Bind_PDL/D/S, Simplified electrostatics)	Dr. Arieh Warshel y Dr. Z.T. Chu. Chemistry Department, USC. Los Ángeles, California. EE.UU.

2.3. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE CÁLCULO

El posible efecto de la mutación H63D en HFE sobre la interacción HFE/TfR1 fue examinado utilizando una función semi-empírica de energía libre. Al utilizar esta aproximación para examinar las diferencias en energía libre de unión causadas por una mutación puntual (H63D), contribuciones como la entropía de asociación y otras contribuciones que no sufren mayores cambios con la mutación y por lo tanto se mantienen iguales para el modelo wt y el mutante, se cancelan mutuamente, de manera que los cambios en la energía libre de unión pueden atribuirse principalmente a contribuciones electroestáticas, no-polares (hidrofóbicas y de *van der Waals*) y entropía de las cadenas laterales, causadas, por el cambio de un aminoácido:

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}} \approx \Delta\Delta G^{\text{elec}} + \Delta\Delta G^{\text{np}} + \Delta\Delta G^{\text{sc}}, \quad (1)$$

donde la doble diferencia ($\Delta\Delta$) corresponde al efecto de la mutación sobre el cambio de energía libre de unión (ΔG_{bind}). Los superíndices ^{elec, np y sc} corresponden a las componentes electroestática, no-polar (hidrofóbica y de *van der Waals*) y entropía de las cadenas laterales respectivamente.

Si bien, considerar los efectos de los cambios estructurales debido a la unión de dos proteínas, es un tema generalizado en todo cálculo de cambio de energía libre de unión (ΔG_{bind}), en este trabajo los asumiremos como pequeños basándonos en los siguientes hechos: i) Se encuentran disponibles las estructuras 3D (cristalográficas) de HFE-Wt y TfR1 así como la del complejo HFE-Wt/TfR1 y se ha reportado que no hay mayores cambios en las estructuras (interfase entre las proteínas) al comparar el complejo con sus componentes por separado. ii) Se ha reportado que los cambios estructurales en HFE a causa de la mutación H63D son pequeños y no afectarían su funcionalidad (como el caso de la mutación C282Y) (Lebrón et al., 1998-1999; Roy & Enns, 1999). iii) Los cambios estructurales a causa de la

formación del complejo pueden considerarse similares para el Wt y el mutante H63D y por lo tanto se cancelarían mutuamente.

En cuanto a las contribuciones no-polares a la energía libre de unión, dos de los tres métodos utilizados (FPDB y Simplified_Electrostatics) no las consideran, mientras que el método PDL/D/S sólo las considera de forma implícita en los cálculos. Sin embargo puesto que la mutación H63D implica a dos aminoácidos ionizables de carga opuesta y que las contribuciones electroestáticas son consideradas actualmente como la contribución más relevante a los procesos de interacción proteína-proteína (Sheinerman, Norel & Honig, 2000), cualquier efecto que la mutación H63D tuviese sobre la energía libre de unión entre HFE y TfR1 será considerado como un efecto mayoritariamente electroestático, por lo tanto asumiremos en este trabajo que:

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}} \approx \Delta\Delta G^{\text{elec}} + \Delta\Delta G^{\text{np}} \quad (2)$$

donde el hecho de que el término $\Delta\Delta G^{\text{np}}$ aparezca de menor tamaño indica su menor relevancia en los cálculos. En consecuencia examinaremos los efectos de la mutación H63D sobre la interacción HFE/TfR1 utilizando tres métodos bioinformáticos basados en el cálculo de energías electroestáticas y sus contribuciones a la interacción entre moléculas.

Debido a que HFE y TfR1 interactúan en dos regiones distintas de la célula intestinal, las cuales poseen distinto pH (7,5 en el espacio extracelular y 6,0 en los endosomas) fue importante considerar esta variación en nuestros cálculos.

Se ha descrito, *in-Vitro*, la disociación del complejo HFE/TfR1 a pH 6,0 (Lebrón et al., 1998-1999; Roy & Enns, 1999).

Por lo tanto con los tres métodos de cálculo seleccionados buscamos obtener resultados para:

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}} = \Delta G_{\text{bind}}^{\text{elec,mut}} - \Delta G_{\text{bind}}^{\text{elec,Wt}} \quad (3)$$

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}} = \Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH,6.0}} - \Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH,7.5}} \quad (4)$$

donde $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ corresponde al cambio en la energía libre de unión debido a la mutación puntual introducida (H63D) y $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ corresponde al cambio en la energía libre de unión debido al cambio de pH (7,5 \rightarrow 6,0). Al aplicar el cambio de pH a tanto a complejos con HFE-Wt como a los que contenían la mutación H63D, se determinó si el pH incide en la magnitud del efecto putativo de la mutación de HFE en la interacción HFE/TfR1. Además, si la predicción del efecto del pH sobre la interacción HFE-wt/TfR1 se correspondía con los datos experimentales disponibles (Lebrón et al., 1998-1999), serviría como control de las cualidades de nuestros modelos.

2.3.1 Estructuras tridimensionales de HFE y TfR1: Obtención, refinamiento, mutación.

Las estructuras 3D de HFE-Wt, TfR1 y el complejo HFE-Wt/TfR1 obtenidas a partir de cristalografía de rayos X fueron adquiridas de la base de datos *Brookhaven Protein Data Bank* (PDB ID: 1A6Z, 1CX8 y respectivamente). Los residuos y/o cadenas laterales faltantes o erróneamente asignados fueron reemplazados por los correctos (según secuencia de aminoácidos) utilizando las librerías *FRAGMENT* y *RESIDUES* del modulo *BIOPOLYMER* del programa *INSIGHT II* (Ver cuadro de Software).

La mutación H63D de HFE fue realizada por reemplazo directo del residuo His por un Asp utilizando el modulo *BIOPOLYMER* de *INSIGHT II* tanto para HFE solo como para HFE en el complejo con TfR1. El campo de fuerza utilizado para las proteínas fue *CVFF* y fue revisado con *PROCHECK* para corregir los ángulos ϕ y ψ de algunos residuos. Luego todas las proteínas fueron sometidas a

minimización (**Steepest descent y Conjugate Gradients con 1000 iteraciones para cada uno**) para relajar las tensiones causadas por el cristal.

2.3.2 Procedimiento utilizado para simular el cambio de pH que sufre la interacción HFE/TfR1 al pasar del medio extracelular a los endosomas.

Como se describió anteriormente, la interacción HFE/TfR1 es dependiente del pH, siendo muy fuerte al pH extracelular, 7,5 y muy débil al pH endosomal 6,0. (Lebrón et al., Roy & Enns, 1999) Puesto que esta puede ser una característica clave de esta interacción, se requirió de un método para poder realizar todos los cálculos a ambos pH's. Para esto se modificó el estado de ionización de los residuos de Histidina (cadena lateral) pues su pKa es cercano a 6,0 y se sabe que es un candidato a sufrir un cambio en su estado de ionización a causa de un cambio del pH. Entonces para todos nuestros cálculos se definió el pH 6,0 como un estado en el que todos los residuos de His tienen carga formal +1,0 y se definió como pH 7,5 el estado en que los residuos de His tenían carga formal 0. Todos los demás residuos se mantuvieron con la carga que presentan a pH 7,0.

2.3.3 Métodos utilizados para calcular la energía libre de unión entre HFE (Wt y H63D) y TfR1.

a.) Método electrostático simplificado. (Simplified Electrostatics Method /S.E.M)

Este método es un modulo del software MOLARIS (Para más detalles ver cuadro de Software) y su función es calcular la contribución electrostática de cada aminoácido presente en la zona de interfase entre dos proteínas. Los aminoácidos que se consideraran como parte de la zona de interacción entre las proteínas son designados arbitrariamente según observación de la estructura. Con ellos se generan dos grupos denominados *a* y *b*. El grupo *a* contiene los aminoácidos designados como "aminoácidos de la

interfase pertenecientes a la proteína *a*” el grupo *b*, contiene los “aminoácidos de la proteína *b* que sean considerados como participantes en la interacción con *a*”. Luego, el programa calcula la interacción electrostática entre pares de residuos, es decir cada residuo del grupo *a* con todos los residuos del grupo *b* y viceversa, mediante la ecuación:

$$\Delta G_{aibj}^{elec} = \Delta G(q_{ai}=0 \rightarrow q_{ai}=\bar{q}_{bj})_{q_{ai}=\bar{q}_{bj}} - \Delta G(q_{ai}=0 \rightarrow q_{ai}=\bar{q}_{ai})_{q_{bj}=0} = \bar{q}_{ai}\bar{q}_{bj}W_{aibj}, \quad (5)$$

donde q_{ai} y q_{bj} corresponde a la carga de los residuos a_i y b_j respectivamente.

Expresando W_{aibj} como:

$$W_{aibj} = \frac{332}{r_{aibj}\epsilon_{aibj}} \quad (6)$$

, donde r_{ij} es la distancia entre los residuos i y j en Å (siendo i del grupo a y j del grupo b), 332 es un valor utilizado para obtener resultados en kcal/mol y ϵ_{ij} la constante dieléctrica definida por la función de distancia:

$$\epsilon_{ij} = \epsilon_{eff} = 1 + \epsilon' (1 - \exp \mu r_{ij}) \quad (7)$$

en la cual $\epsilon' = 60$ y $\mu = 0,16$. De una manera más general, se puede designar un valor fijo para la constante dieléctrica a utilizar, según el carácter de la interacción. Si la interacción es carga-carga se utiliza $\epsilon_{ij} = 40$ y si la interacción es carga-dipolo o dipolo-dipolo, se utiliza $\epsilon_{ij} = 4$ para compensar los efectos de polarización y reorganización que no se consideran explícitamente.

Luego, el componente electrostático de la energía libre de unión entre los grupos a y b puede aproximarse a la energía libre de unión entre las dos proteínas cuya zona de interfase quedó definida por dichos grupos, quedando expresada como:

$$\Delta G_{bind} \approx \Delta G_{bind_{a \rightarrow b}}^{elec} = W_{aibj} \sum_{i=1}^a q_{ai} \sum_{j=1}^b q_{bj} \quad (8)$$

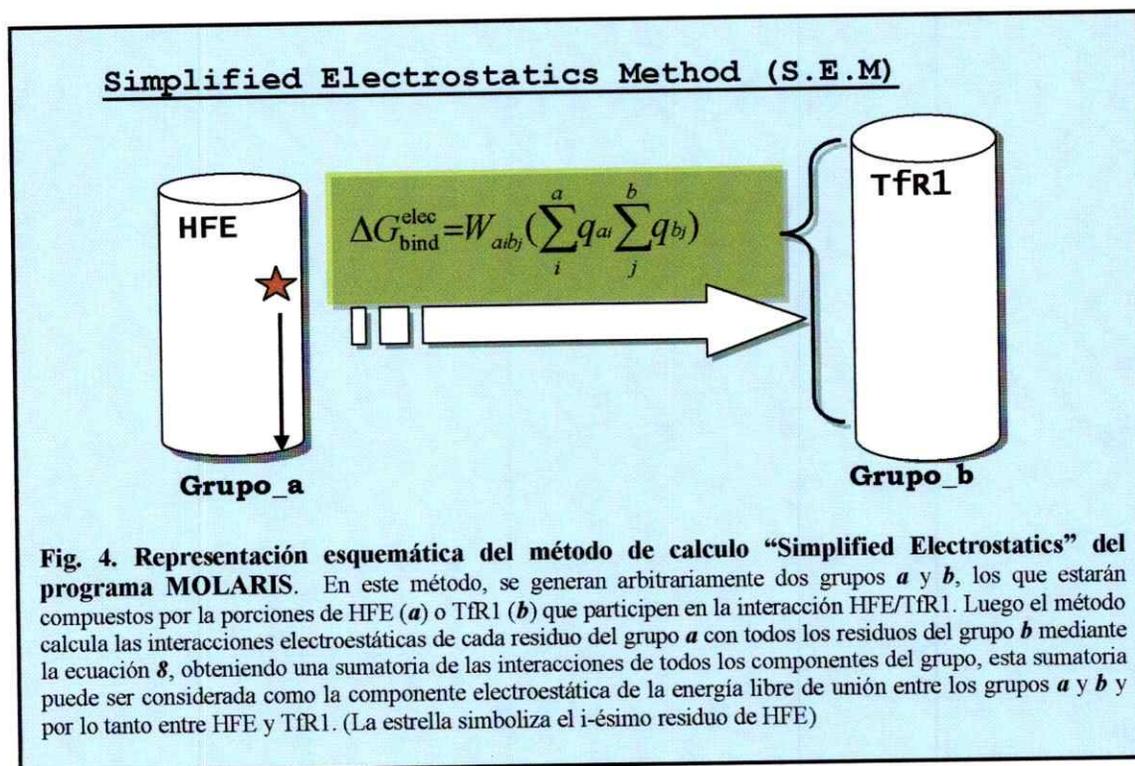
Para más detalles sobre este método y su desarrollo matemático ver Lee, Chu & Warshel 1982; Muegge, Shweins & Warshel 1998.

Para la interacción HFE (wt ó H63D)/TfR1 los grupos *a* y *b* fueron definidos de la siguiente manera: El grupo *a* contiene los residuos 60 – 110 de HFE, que corresponden mayormente a los residuos de las α -hélices α_1 y α_2 además del loop entre ellas. El grupo *b* contiene a los residuos 496 – 593 de TfR1 correspondientes a las α -hélices 1 y 2 de su dominio helical, las cuales forman la interacción con HFE. Los valores de $\Delta\Delta G_{bind}^{elec}$ ya sea por efecto del pH o de la mutación H63D de HFE, se obtuvieron

mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta G_{bind}^{mut} = \Delta G_{bind}^{H63D} - \Delta G_{bind}^{Wt} \quad (9)$$

$$\Delta\Delta G_{bind}^{pH} = \Delta G_{bind}^{6.0} - \Delta G_{bind}^{7.5} \quad (10)$$



b.) Método “Resolución lineal de la ecuación de Poisson-Boltzmann mediante el método de diferenciación finita” (Finite Difference Poisson-Boltzmann /FDPB)

Este método de cálculo, implementado en el modulo DELPHI del paquete de programas INSIGHT II, permite calcular la distribución del potencial electrostático en una proteína. Consiste en un método para resolver de forma lineal la ecuación de *Poisson-Boltzmann* que considera a la proteína y al solvente como dos continuos dieléctricos con una frontera discreta entre ellos, donde el solvente corresponde a todo el espacio de una caja periódica (*grid*), definida arbitrariamente, que no es ocupado por la proteína. Para la aplicación de este método se requiere el uso del método diferenciación finita, dada la uniformidad y rugosidad de la frontera PROTEÍNA-SOLVENTE.

Este método calcula la energía libre electrostática total de las moléculas y esta tiene la siguiente forma:

$$\Delta G_{\text{tot}}^{\text{elec}} = \sum_i q_i \phi_i \quad (11)$$

donde q_i representa la carga de cada átomo y ϕ_i es el potencial total en esa carga debido a todas las otras cargas y al apantallamiento por solvente. Entonces el cambio en la energía libre electrostática a causa de la unión entre HFE y TfR1 (paso desde HFE y TfR1 libres a la formación del complejo) se representa como:

$$\Delta G_{\text{tot}}^{\text{elec}} = \frac{1}{2} \sum_i q_i \Delta \phi_i \quad (12)$$

donde $\Delta \phi_i$ corresponde al cambio en el potencial electrostático a causa de la unión entre HFE y TfR1.

Para calcular los cambios en energía libre electrostática por efecto de una mutación puntual, la contribución de dicho residuo a la energía libre de unión puede calcularse de la siguiente forma:

$$\Delta G^{\text{elec}} = \frac{1}{2} \sum_i q_i \Delta \phi_i^{\text{rxn}} + \sum_i q_i \Delta \phi_i^{\text{int}}, \quad (13)$$

donde la suma es sobre todas las cargas atómicas qi del residuo en cuestión. $\Delta\phi_i^{ext}$ es el cambio en el potencial electrostático en la i -ésima carga del residuo mismo (potencial de reacción o solvatación) al producirse la formación del complejo. $\Delta\phi_i^{int}$ es el cambio en el potencial en la i -ésima carga debido a todas las otras cargas de ambas proteínas al momento de acomplejarse.

Cabe destacar, que el primer y segundo término de la ecuación (13), corresponden a las contribuciones de solvatación e interacciones carga-carga del residuo i a la energía electrostática respectivamente. Los cambios o reorganizaciones que podrían ocurrir en otros residuos no-mutados no se calculan explícitamente, si no que el uso de una constante dieléctrica 4 para las proteínas permite la inclusión implícita de la reorganización de los dipolos y la polarizabilidad electrónica.

La contribución a la energía libre de unión se obtiene realizando cálculos con el método FDPB a las proteínas en el estado disociado y en el complejo, obteniendo luego la diferencia entre ambas, es decir: $\Delta G^{elec} = (\text{Complejo} - (\text{HFE} + \text{TfR1}))$. Luego, para obtener el efecto de la mutación H63D de HFE, o del cambio de pH sobre la energía libre electrostática (de unión), $\Delta\Delta G^{elec}$, se realiza la diferencia en ΔG^{elec} entre el estado silvestre y el mutante, o entre el estado pH 6,0 y 7,5:

$$\Delta\Delta G_{bind}^{mut} \approx \Delta\Delta G^{elec} = \Delta G_{H63D}^{elec} - \Delta G_{Wt}^{elec} \quad (14)$$

$$\Delta\Delta G_{bind}^{pH} \approx \Delta\Delta G^{elec} = \Delta G_{6,0}^{elec} - \Delta G_{7,5}^{elec} \quad (15)$$

En este trabajo se utilizó este método para dos objetivos:

- i) Generación de un mapa de potencial electrostático tanto de HFE (wt y H63D) como de TfR1 de manera de observar la existencia de complementariedad de cargas entre HFE y TfR1 y si el cambio de pH (7,5 \rightarrow 6,0) y/o la mutación H63D producían un efecto sobre la distribución del potencial electrostático en HFE. Los resultados a obtener de estos mapas son meramente cualitativos.

- ii) Cálculo de los cambios en la componente electrostática de la energía libre de unión entre HFE y TfR1 ya sea por causa de la mutación (H63D) o por el cambio de pH (7,5 → 6,0).

Los parámetros utilizados para llevar a cabo estos experimentos comprenden: 1) el tamaño de la caja periódica, 2) la constante dieléctrica del medio y la proteína, 3) el nivel de convergencia del cálculo, 3) el tipo de frontera proteína-solvente y fueron configurados de la siguiente manera para todos los cálculos:

- Tamaño de la caja periódica (*Grid dimensions*): 161 en cada dirección con una escala de 2grids/Å aprox.
- Condiciones de borde o frontera (*Boundari conditions*): Borde completamente Coulómbico (aprox. de Debye-Huckel).
- Valor final de convergencia: 1×10^{-4} kT/e como valor final de error residual en el potencial.

*(Para más detalles sobre el desarrollo e implementación de este método de cálculo ver: Sharp, K.A.1998 y www.accelrys.com)

c.) “Protein Dipoles Langevin Dipoles Semi-Macroscopic Method” o PDL/D/S.

Este método, parte del programa MOLARIS, es una mezcla de características de modelos microscópicos y macroscópicos, que permite gozar de la mayor precisión de los métodos microscópicos, con la rapidez y facilidad de los métodos macroscópicos, al calcular energías electrostáticas. La característica más importante de este método es la representación explícita del solvente, no como un continuo dieléctrico, sino como un conjunto de dipolos puntuales llamados dipolos de *Langevin* (dado que siguen las leyes de polarización de Langevin). Estos dipolos, que están fijos en una grilla cúbica, son capaces de representar la polarización promedio del agua en cualquier punto del sistema ocupado por ellos. Junto con esto, el programa considera explícitamente todas las cargas y dipolos permanentes de la(s) proteína(s), así como también todas las interacciones carga-carga, carga-dipolo y dipolo-dipolo, entre una proteína y el

solvente y/o una proteína y un ligando (u otra proteína). Sin embargo, hay ciertas interacciones, como por ejemplo el caso de los dipolos inducidos, que son consideradas implícitamente mediante el valor designado para la constante dieléctrica de la(s) proteína(s) presentes en el sistema.

De la misma manera que los métodos mencionados anteriormente, este método permite calcular la contribución electroestática a la energía libre de unión y ciertas contribuciones no-polares (hidrofobicas y vdw) a la interacción entre una proteína y un ligando o entre dos proteínas. Sin embargo, las contribuciones no-polares no son descritas explícitamente.

Para lograr sus objetivos, el sistema es sometido a un ciclo termodinámico (Fig.5) que considera a una de las proteínas como receptor y a la otra, o parte de la otra, como ligando. Dentro de este ciclo, los pasos más relevante incluyen cálculos para ambas proteínas separadas en agua y luego juntas en agua, además se considera el efecto sobre la unión cuando el “ligando” no esta cargado (medición de efectos no-polares en la interacción) y también se consideran las energías libres de solvatación al llevar en cada caso la constante dieléctrica del medio desde $\epsilon_w = 80$ hasta ϵ_p (o ϵ_{in} , que es el valor designado para la cte. en la proteína, para discusión ver review de Schutz y Warshel, 2001). Como puede observarse en la figura N°5, el ciclo se divide en dos partes: El ciclo interior (a, d, e, h), el cual describe de forma microscópica, la contribución electroestática ($\Delta G_{bind,l}^{elec}$) a la energía libre de unión absoluta de un ligando a una proteína, donde la conformaciones, tanto de la proteína como del ligando se mantienen sin cambio, pero el solvente puede sufrir relajaciones en cada paso del ciclo.

Los ciclos exteriores (a, b, d, h) y (h, e, f, g) se utilizan para obtener las estimaciones semi-macroscópicas de las energías electroestáticas relevantes. Esto es llevado a cabo mediante el ciclo PDL/D/S de tres pasos, donde la constante dieléctrica del solvente pasa de ϵ_w a ϵ_{in} , luego las cargas del ligando son cambiadas (según el caso pasan de 0 a q o viceversa) y finalmente la constante dieléctrica

del solvente vuelve a ser ϵ_w . De acuerdo a lo anterior, la energía libre total de unión puede expresarse como:

$$\begin{aligned} (\Delta G_{\text{bind}})_{s' \rightarrow s} &= (\Delta G_{\text{bind}}^{\text{elec}})_{s' \rightarrow s} + (\Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{vdw}} - T\Delta S')_{s' \rightarrow s} \\ &= (\Delta G_{\text{elec}}^P)_s - (\Delta G_{\text{elec}}^W)_{s'} + (\Delta G_{\text{elec}}^{I'})_{s' \rightarrow s} + (\Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{vdw}} - T\Delta S')_{s' \rightarrow s} \end{aligned} \quad (16)$$

donde I representa al ligando en su estado cargado (nativo) y I' se refiere al ligando cuando todas sus cargas son llevadas a 0. $()_s$ indica que la forma correspondiente es evaluada en una única configuración (s para el complejo y s' cuando ligando (I) y proteína (P) se encuentran en el estado disociado). El término ΔG_{elec}^W corresponde a la energía de solvatación del ligando en agua (sin las contribuciones hidrofóbicas y de *van der Waals*). ΔG_{elec}^P es el cambio en la contribución electrostática a la energía de solvatación del complejo ($P+I$) al cargar el ligando ($I' \rightarrow I$) y $\Delta G_{\text{elec}}^{\text{bind}}$ es la contribución electrostática a la energía libre de unión del ligando no cargado I' . ΔG_{hyd} y ΔG_{vdw} corresponden a las contribuciones hidrofóbicas y de *van der Waals* a la energía de unión respectivamente, y $-T\Delta S'$ representa la contribución entrópica asociada con la unión del ligando no cargado.

De acuerdo a lo anterior, la ecuación 16 es evaluada utilizando el modelo PDL/D/S, lo cual significa reemplazar los términos microscópicos ΔG_{elec} por sus contrapartes semi-macroscópicas. Para este fin, se utilizan los ciclos exteriores ((h,e,f,g) y (a,b,c,d)) (ver Fig.5) donde la constante dieléctrica del medio es llevada desde ϵ_w a un valor que corresponde a la constante dieléctrica asumida para la proteína ϵ_{in} . Las contribuciones PDL/D/S en los diferentes pasos del ciclo se encuentran en la Fig. 5.

Si bien, todo lo descrito hasta ahora sobre este método está diseñado en base a cálculos de unión proteína-ligando, en nuestro caso decidimos seguir este camino y tomar una porción de una de las proteínas para hacerla semejante a un ligando. Además, debido a que intentar obtener estructuras

promedio (que representen la reorganización de la(s) proteínas al separarse el complejo) mediante dinámica molecular (MD) genera muchos resultados probables, pero no necesariamente precisos, decidimos utilizar el método PDL/S en el cual la reorganización de la(s) proteínas es ignorada, es decir, se considera sólo la estructura original del complejo y la parte superior del ciclo de la Fig. 5, sin considerar la relajación de las proteínas. Entonces la contribución electrostática a la energía libre de unión queda expresada como:

$$\Delta G_{bind}^{elec} = \left\langle \left(\Delta G_{sol}^{PL+PP} - \Delta G_{sol}^{PL} - \Delta G_{sol}^{PP} \right) \left(\frac{1}{\epsilon_{in}} - \frac{1}{\epsilon_{v}} \right) + \frac{\Delta V_{q\mu}^{PL}}{\epsilon_{in}} \right\rangle_{(PL+PP)} \quad (17)$$

donde ΔG_{sol}^{PL+PP} , ΔG_{sol}^{PL} , ΔG_{sol}^{PP} corresponden a las contribución electrostática a la energía libre de solvatación del complejo proteína-ligando, el ligando solo y la proteína sola respectivamente, $\left(\frac{1}{\epsilon_{in}} - \frac{1}{\epsilon_{v}} \right)$

es un término utilizado para escalar desde el sistema microscópico al sistema semi-microscópico y $\Delta V_{q\mu}^{PL}$ corresponde a las interacciones electrostáticas del ligando en el vacío. Con este método entonces, si bien estamos considerando proteínas y solvente como continuos con constantes dieléctricas continuas, la representación explícita de todos los átomos, cargas y dipolos, junto con la representación explícita del solvente (dipolos de Langevin), permite utilizar dichos parámetros microscópicos, con una base física concreta, y realizar tratamientos semi-macroscópicos que entreguen resultados precisos sin ser computacionalmente muy costosos. Para más discusión y detalles acerca de este método referirse a: Lee, Chu & Warshel 1982 ; Muegge, Shweins & Warshel 1998; Schutz & Warshel 2001).

Para llevar a cabo el ciclo termodinámico y los cálculos anteriormente descritos, el programa **MOLARIS** divide el sistema en 4 regiones. La *Región I* contiene los residuos cargados que serán considerados como proteína ligando (residuos de interés). La *Región II*, contiene los átomos de la otra proteína, que queden incluidos dentro de una esfera de 19 Å de radio desde el centro de la *Región I*. La

Región III es la grilla de *Langevin* convertida en esfera. Esta esfera está compuesta por dipolos de *Langevin* que representan el solvente. La *Región IVa* contiene el resto de la proteína que no quedo dentro de la *Región II* y la *Región IVb* es tratada como un continuo dieléctrico. Las interacciones y contribuciones electrostáticas de las *Regiones I, II y III* son tratadas explícitamente, mientras que aquellas en la *Región IV(a y b)* se consideran como regiones de solvente sobrante y son tratadas como un continuo macroscópico. En nuestro caso el sistema utilizado, para todos nuestros cálculos con el programa **MOLARIS (PDL/D/S)** quedó configurado de la siguiente manera y son representados esquemáticamente en **Fig6**:

- **Región I:** Definida como un trozo de 12 residuos de aminoácido de la hélice nº1 del dominio helical de Tfr1, compuesta por los residuos desde L618 hasta A630 (LLSPVRDLNQYRA). En esta sección se encuentran los residuos más relevantes de Tfr1 para su interacción con HFE (Lebrón et al., 1998-1999).
- **Región II:** Incluye todos los átomos de HFE que quedan dentro de una esfera de 19 Å de radio, cuyo centro corresponde al centro de la *Región I*. Entre los residuos que se incluyen en nuestra *Región II* esta la totalidad de las hélices a1 y a2 y el loop entre ellas, los cuales conforman la zona de interacción de HFE (incluidos residuos cruciales para su interacción con Tfr1 como V78 y W81 (Lebrón et al., 1998-1999) y además se encuentra el residuo 63 que contendrá la mutación cuyo efecto sobre la interacción HFE/Tfr1 deseamos analizar.
- **Región III:** Como se dijo más arriba esta compuesta por dipolos de *Langevin* que representan el solvente de manera explícita.
- **Región IV:** Compuesta por el resto de los átomos de HFE que no caben dentro de la *Región II* y por sectores del solvente que son tratados como un continuo no-explicito.

Fig. 5. Ciclos termodinámicos utilizados en estudios de unión de un ligando (l) a una proteína (p) mediante el método PDL/D/S de MOLARIS.

Estos ciclos sólo consideran las contribuciones electrostáticas a la energía libre de unión. Esto se logra al cambiar las cargas del ligando de su valor real (cuadrado negro) a cero (cuadrado achurado). El ciclo interno (a,b,d,h) describe el proceso de unión a nivel macroscópico. Los ciclos exteriores (a, d, c, b) y (h, e, f, g) se utilizan para obtener las estimaciones semi-macroscópicas de las energías electrostáticas relevantes. Esto se lleva a cabo utilizando el ciclo de tres pasos del sistema PDL/D/S, en los cuales, la constante dieléctrica del solvente es cambiada de ϵ_w a ϵ_{in} (donde ϵ_{in} es la constante dieléctrica utilizada para las macromoléculas) y luego vuelve a pasar de ϵ_{in} a ϵ_w .

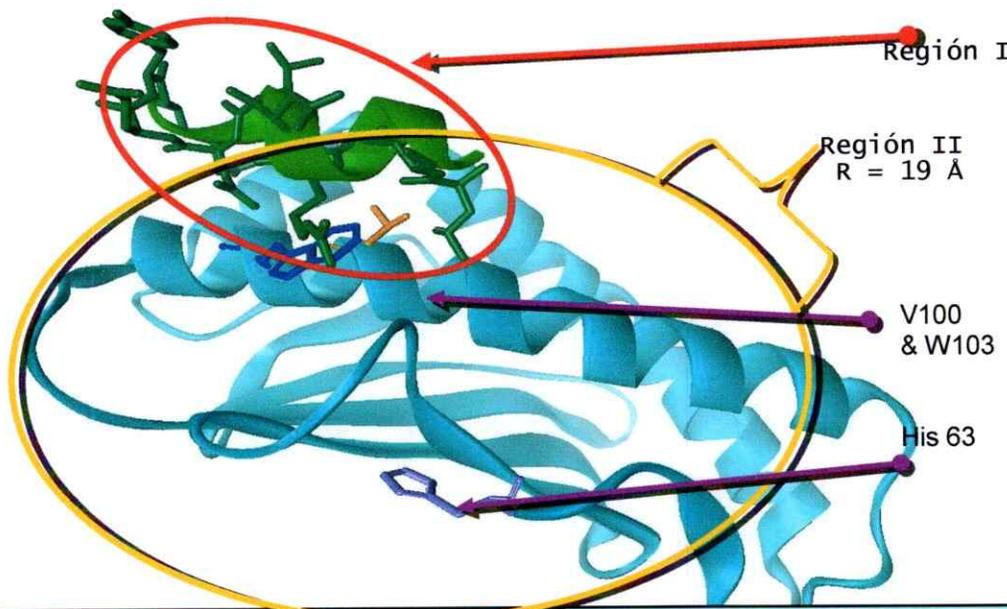
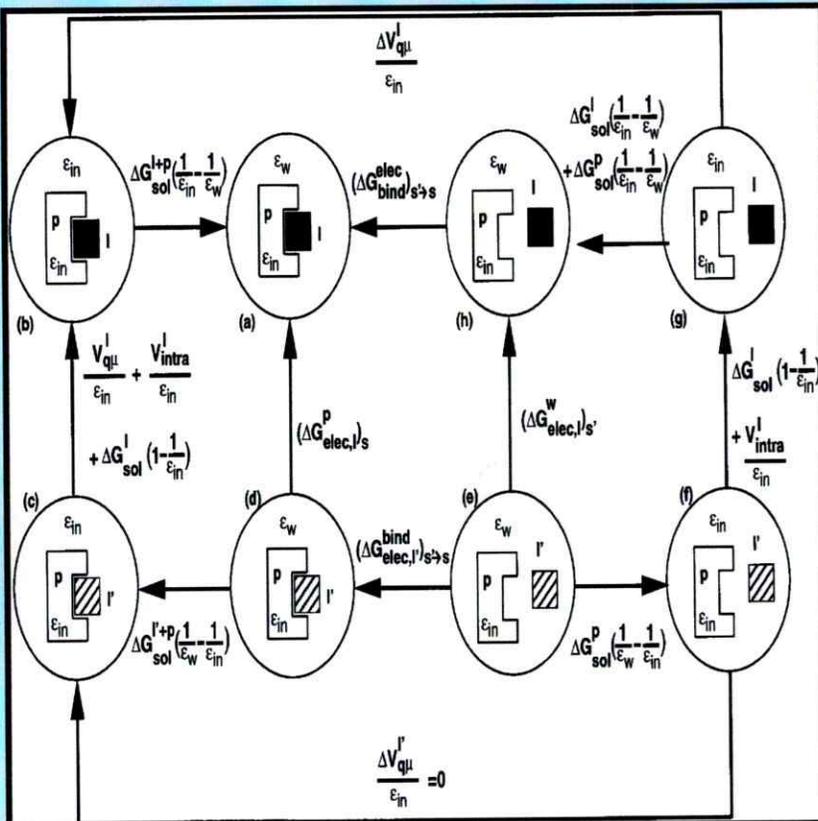


Fig6. Representación esquemática de las regiones utilizadas para nuestros cálculos con el método PDL/D/S del programa MOLARIS.

Se describen aquí la estructura de las regiones I y II generadas. En rojo, se observa la **Región I** compuesta por un trozo de la hélice 1 del dominio helical de TfR1. La **Región II** esta compuesta por todos los átomos que quedan dentro del círculo (esfera) amarillo, el cual tiene un radio de 19 Å desde el centro de la **Región I** y esta compuesto, como se observa, de las hélices α_1 y α_2 de HFE y el loop que las conecta, incluyendo el residuo 63.

Se exponen en esta sección los resultados obtenidos utilizando los tres métodos bioinformáticos descritos anteriormente (sección 2.3) con los que se modeló mediante aproximaciones similares, el efecto de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1. Además, puesto que el carácter dependiente del pH de dicha interacción es conocido y ha sido establecido experimentalmente (Lebrón et al., 1998-1999; Roy & Enns, 1999), todos los cálculos fueron realizados a pH 7,5 y 6,0 (utilizando el método descrito en la sección 2.3) de manera de corroborar si nuestros sistemas de cálculo podían reproducir el efecto del pH observado para la interacción HFE/TfR1 y si éste tenía algún efecto diferente sobre dicha interacción al encontrarse presente la mutación H63D de HFE.

3.1 Mapa de potencial electrostático de HFE(wt y H63D) y TfR1 a pH 6.0 y 7.5.

Los mapas de potencial electrostático, obtenidos mediante el programa DELPHI (FDPB) permiten observar de manera cualitativa los cambios en la distribución de potencial electrostático en las proteínas que puedan ocurrir a causa de mutación, cambios de pH por ejemplo.

En primer lugar se obtuvieron mapas de potencial electrostático para HFE-wt y TfR1, por separado, a pH 7,5 y puede observarse complementariedad electrostática entre las zonas de interacción de ambas proteínas, siendo la zona de interacción de TfR1 electrostáticamente positiva (azul) y la zona de interfase de HFE-Wt más bien electrostáticamente negativa (rojo) a neutra (blanco). Al variar el pH de 7,5 a 6,0 (cambio en el estado de ionización de los residuos de His) se observó en HFE-wt una neutralización (paso de rojo a blanco) de las zonas de potencial electrostático negativo ubicadas en, y

cerca de, la zona de interacción, mientras que la interfase de TfR1 se hizo aun más positiva, lo que podría ser un indicador de la disociación del complejo HFE/TfR1 a pH 6,0 se debe en parte a una disminución en la complementariedad electroestática a causa de la acidificación del medio.

Se realizaron luego los mismos mapas, pero esta vez para HFE-H63D a pH 7,5 y se observó un incremento del potencial electroestático negativo en las zonas cercanas al residuo 63 y en la zona de interacción. Al cambiar el pH a 6,0; no se observó la neutralización de las zonas de potencial electroestático negativo observada en HFE-Wt. Todo esto sugiere que la mutación H63D de HFE produce un cambio en la distribución de potencial electroestático en la superficie de interacción de HFE. Esto podría traducirse en un incremento en la complementariedad de potencial electroestático entre HFE y TfR1 a ambos pHs lo que resultaría, a su vez, en un aumento de la afinidad entre ambas proteínas.

(Fig7)

3.2 Simplified Electrostatics Method.

Con este método simplificado se realizó una primera aproximación al cálculo de las energías libres de unión con el fin de establecer de forma cuantitativa el efecto de la mutación H63D de HFE observado de manera cualitativa en la sección anterior. Como este método es puramente *Coulómbico*, sólo entregaría los cambios en la componente electroestática de la energía libre de unión, pero puesto que el pH y la mutación H63D tendrán mayoritariamente un efecto sobre esta componente. Los cambios en ésta, podrán traducirse o aproximarse a cambios en la energía libre de unión absoluta.

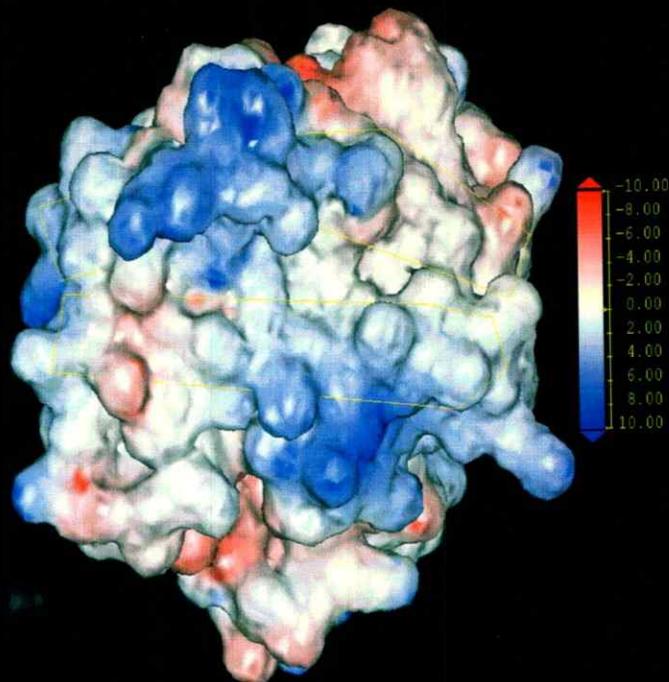
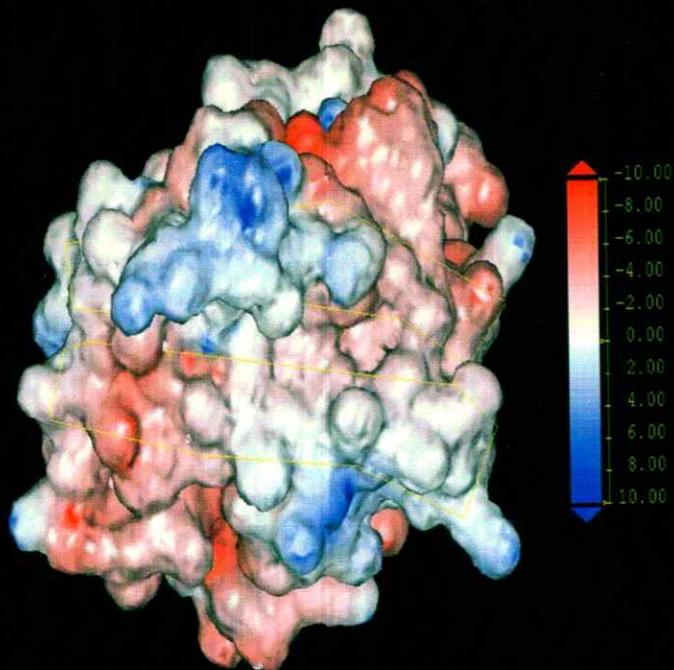
En primer lugar se calculó la energía electroestática libre de unión entre HFE y TfR1 a pH 7,5 y 6,0 en los cuales el valor obtenido para el pH 7,5 se consideraran como el nivel cero o estabilidad inicial. En

pH 7,5

pH 6,0

a) HFE-wt

b) HFE-wt



c) HFE-H63D

d) HFE-H63D

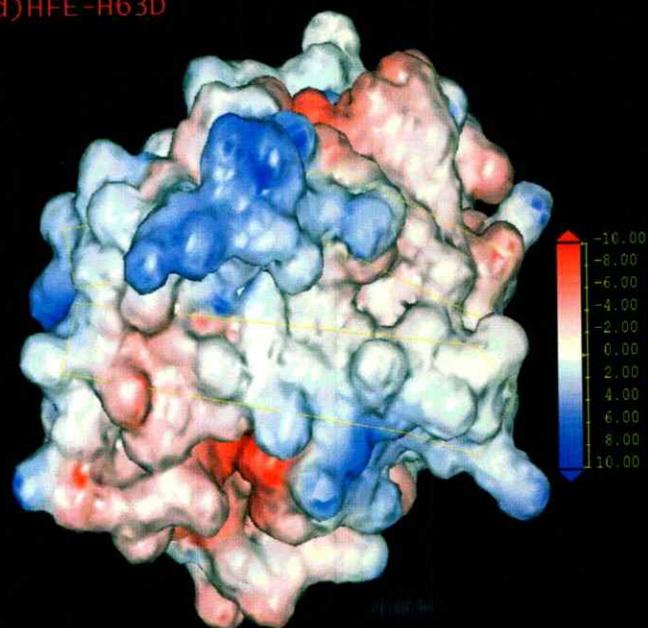
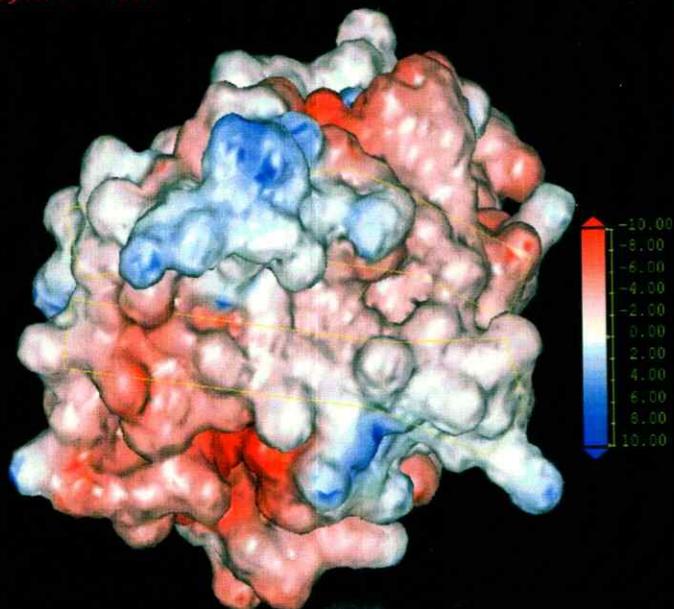


Fig7.1 Mapas de potencial electrostático para HFE-wt, HFE-H63D a pH 7,5 y 6,0.

En los paneles a – d se muestran los mapas de potencial electrostático para HFE-Wt y HFE-H63D. Se puede observar claramente que HFE-Wt sufre un notable cambio en la distribución de potencial en su superficie de interacción al pasar de pH 7,5 a 6,0 (paneles a y b), cambio que tiende hacia la neutralización y positivización de dicha superficie. En el caso de HFE-H63D (paneles c y d) se observa que la presencia de la mutación disminuye el efecto del pH sobre la distribución de cargas en la superficie de interacción, manteniéndola en una configuración similar a la observada a pH 7,5. Nótese que HFE esta siendo observado desde arriba, es decir, la superficie que se expone en la figura corresponde mayoritariamente al súper dominio $\alpha 1-2$. La escala a la derecha de cada molécula representa el potencial electrostático y va de -10 (rojo) a 10 (azul) kT/e.

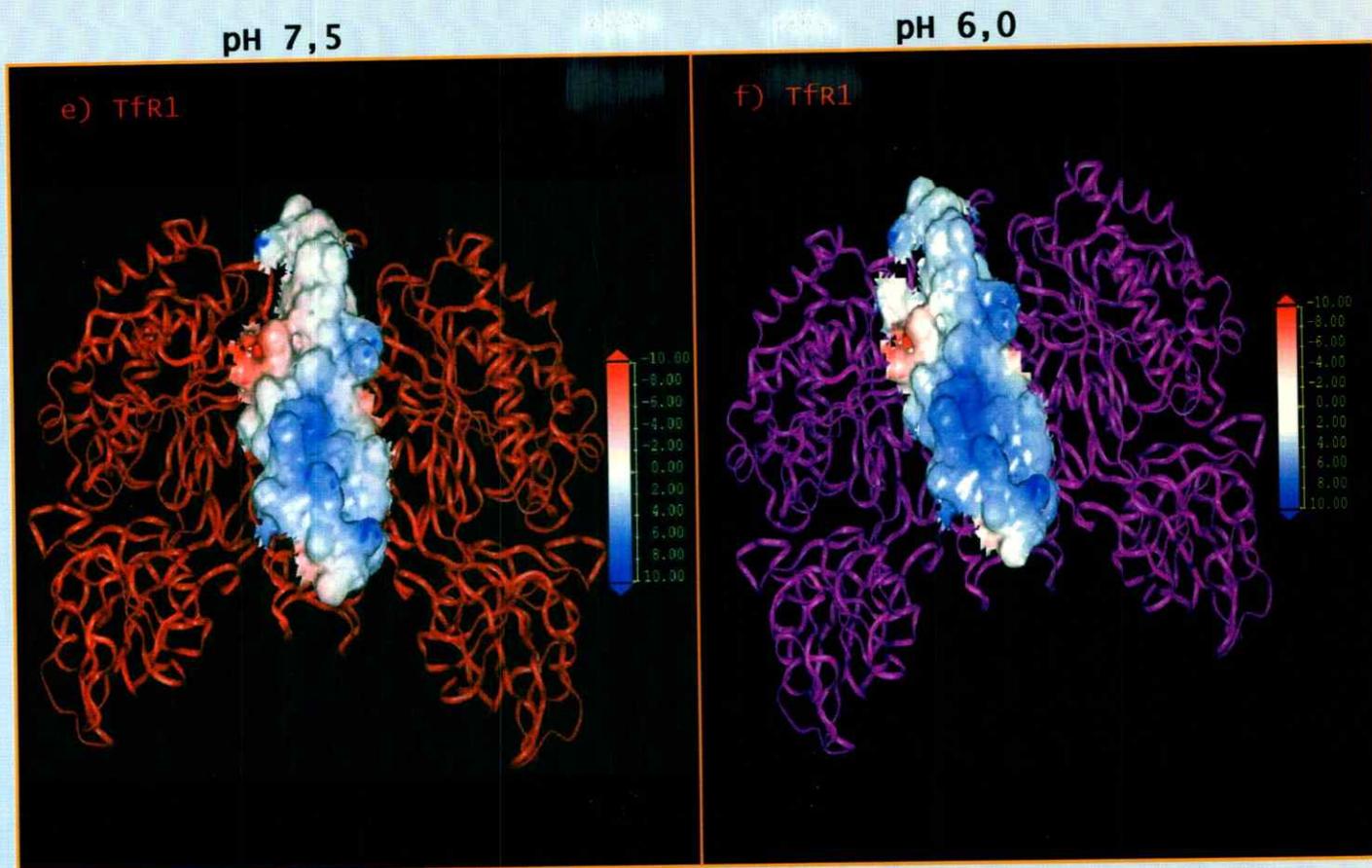


Figura 7.2 Mapas de potencial electrostático para TfR a pH 7,5 y 6,0.

Se muestra en los paneles e y f el comportamiento de la zona de interacción de TfR1 con HFE (zona con superficie sólida) frente al paso de pH 7,5 (panel e) a pH 6,0 (panel f). Se observa que TfR1 pasa de ser relativamente positivo a pH 7,5 a más positivo aun a pH 6,0; con lo cual se puede inferir que el cambio en la distribución de cargas en HFE-Wt y TfR1 al pasar a pH 6,0 disminuye significativamente la complementariedad electrostática observada entre ambos a pH 7,5. Sin embargo, esta pérdida de complementariedad a pH 6,0 es menor cuando HFE presenta la mutación H63D, e incluso, es aparentemente mayor o más notoria a pH 7,5 comparado con HFE-Wt. La escala a la derecha de cada molécula representa el potencial electrostático y va de -10 (**rojo**) a 10 (**azul**) kT/e.

los resultados obtenidos con este método, se observó un aumento en la energía libre de unión a pH 6,0; es decir, el complejo pierde estabilidad al pH endosomal con un $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ de 16.3 kcal/mol, lo cual es termodinámicamente significativo como para sugerir la disociación del complejo en este pH.

Luego se realizaron los cálculos de energía electrostática libre de unión para el complejo HFE-H63D/TfR1 a pH 7,5 y se observó un leve aumento de la estabilidad de interacción ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$) de -1.5 kcal/mol lo que podría corroborar lo observado en los mapas de potencial electrostático. (Ver Fig7.1/7.2)

A continuación se repitieron los cálculos anteriores, pero esta vez a pH 6,0. El valor de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ obtenido fue -3,7 kcal/mol lo que acorde a lo observado en 3.1 (Fig7.1/7.2) podría sugerir que la interacción entre HFE-H63D y TfR1 se hace más estable a ambos pH's. Sin embargo, la mutación parece tener un efecto mayor sobre la interacción al pH endosomal, esto podría traducirse en una menor tasa de disociación del complejo HFE-H63D/TfR1 en los endosomas.

Estos resultados, resumidos en la **Tabla2** podrían entregar una explicación al porqué no se observó un aumento de la presencia apical de HFE-H63D al ser sobre-expresado en células Caco2 (Arredondo et al. 2004) siendo que este aumento si se observó al sobre-expresar HFE-Wt (Arredondo et al. 2003-04)(Tabla 1 y Fig.3) puesto que, si disminuye la tasa de disociación entre HFE-H63D y TfR1, una mayor proporción de HFE-H63D seguirá el curso de reciclaje de TfR1 y no podría traficar a la zona apical de la célula.

Tabla 2. Resultados de los cálculos de energía libre de interacción entre HFE(Wt & H63D) y Tfr1 realizados mediante el método “*Simplified Electrostatics*” del software **MOLARIS***

† $\Delta\Delta G_{bind}^{pH}$	(HFE-wt)	16,3
† $\Delta\Delta G_{bind}^{pH}$	(HFE-H63D)	14
§ $\Delta\Delta G_{bind}^{mut}$	(pH=7,5)	-1,3
§ $\Delta\Delta G_{bind}^{mut}$	(pH=6,0)	-3,7

* Todos los valores en Kcal/mol
 § Representa el efecto de la mutación H63D sobre la energía libre de unión entre HFE y Tfr1. ($\Delta G_{bind}^{HFE-H63D} - \Delta G_{bind}^{HFE-Wt}$)
 † Representa el efecto de la variación del pH desde 7,5 a 6,0 sobre la energía libre de unión entre HFE (Wt & H63D) entre HFE y Tfr1. ($\Delta G_{bind}^{6,0(Wt)} - \Delta G_{bind}^{7,5(Wt)}$ ó $\Delta G_{bind}^{6,0(H63D)} - \Delta G_{bind}^{7,5(H63D)}$)

3.3 Resolución Lineal de la ecuación de Poisson-Boltzmann mediante el método de la diferencia finita (FDPB) (Modulo DELPHI de InsightII)

Como se explicó en la sección Materiales y Métodos, este programa sitúa una proteína dentro de una caja periódica, en la cual los espacios no ocupados por la molécula son simulados como un continuo dieléctrico que representa al solvente y para el cual se utiliza la constante dieléctrica del agua ($\epsilon=80$).

La proteína, es simulada como otro continuo dieléctrico con $\epsilon=4$ y se le es asignado, además del campo de fuerza, un set de cargas para representar la distribución de estas en la proteína (dicho “set” de cargas esta compuesto por información empírica sobre las cargas de cada aminoácido). Luego mediante iteraciones lineales de la ecuación de Poisson-Boltzmann se obtiene la energía electrostática total de la proteína.

Para obtener valores de energía libre de unión entre HFE y TfR1 se realizaron los cálculos de energía electrostática total de las dos proteínas por separado y del complejo HFE/TfR1 para luego realizar la diferencia:

$$\Delta G_{\text{bind}} = (\text{Complejo}) - ((\text{HFE})+(\text{TfR})).$$

Este procedimiento, al igual que con el método anterior, se realizó para los sistemas HFE-Wt/TfR1, HFE-H63D/TfR1 a pH 6,0 y 7,5. Como ya lo habían sugerido los mapas de potencial electrostático (Fig7), los que se obtienen utilizando este mismo software, se observó en los resultados obtenidos un aumento de la estabilidad del complejo HFE/TfR1 cuando HFE llevaba la mutación H63D, sobre todo, a pH 6,0.

Los resultados se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resultados de los cálculos de energía libre de unión entre HFE(Wt & H63D) y TfR1 realizados mediante el método “*Finite Difference Poisson-Boltzmann*” (FDPB) del modulo DELPHI del paquete InsightII ‡

† $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ Wt	47,1
† $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ H63D	35,3
§ $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ 7,5	-0,4
§ $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ 6,0	-12,2

‡ Todos los resultados en kcal/mol

§ Representa el cambio en energía libre de unión producido por la introducción de la mutación H63D en HFE

† Representa el cambio en la energía libre de unión entre HFE y TfR1 al pasar de pH 7,5 a 6,0 (paso desde el medio extracelular al medio endosomal)

Como se menciona en la sección 2.33, este método simula la interacción proteína-ligando, en la cual el **ligando** corresponde a la porción de la *hélice 1* del dominio helical de TfR1 que contiene los aminoácidos más relevantes para la interacción con HFE. Sin embargo a pesar de esta situación, este método tiene la ventaja de representar de manera explícita el solvente y gran parte de las interacciones entre proteína-proteína y proteína-solvente, además de considerar la contribución no polar y el efecto de mutación y/o cambio de pH sobre la energía de solvatación de la proteína y el ligando al unirse.

Con este método calculamos la energía libre de unión (componente electrostático + componente no polar de manera implícita) entre HFE y TfR1 a pH 7,5 y 6,0 y cálculo de la energía libre de unión para HFE-H63D y TfR1 a pH 7,5 y 6,0. Luego con los valores de ΔG_{bind} totales realizamos las diferencias pertinentes para obtener los valores de $\Delta\Delta G_{\text{mut}}$ ($\Delta G_{\text{H63D}} - \Delta G_{\text{wt}}$) y $\Delta\Delta G_{\text{pH}}$ (efecto cambio pH. $\Delta G_{6,0} - \Delta G_{7,5}$) correspondientes al cambio en la energía libre de unión a causa de la mutación H63D y del pH respectivamente

Los resultados, resumidos en la **Tabla 4** entregaron un $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ de 9,8 kcal/mol para la interacción HFE-wt/TfR con lo que se infiere la correcta predicción del efecto del pH sobre la interacción al igual que en los otros métodos. Para el caso de la mutación H63D de HFE el $\Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ fue de 5,62 kcal/mol y

$\Delta\Delta G_{\text{bind pH7,5}}^{\text{mut}}$ de -0,9 kcal/mol y $\Delta\Delta G_{\text{bind pH6,0}}^{\text{mut}}$ de -3,8 kcal/mol.

Estos valores vuelven a sugerir que la mutación H63D de HFE produce un efecto estabilizador del complejo HFE/TfR1, el cual es más fácilmente observable a pH 6,0. Esto puede explicarse por el

cambio de ionización en las His al pasar de pH 7,5 a 6,0; pues el aumento de su carga formal de 0 a +1,0 produce la pérdida parcial de la complementariedad de cargas entre ambas proteínas, por lo que el cambio de His a Asp, el cual posee carga formal -1,0 a ambos pH's (6,0 y 7,5) será más notorio al pH endosomal (6,0).

Tabla 4. Resultados de los cálculos de energía libre de unión entre HFE(Wt & H63D) y TfR1 realizados mediante el método "Bind, PDL/D/S" del software MOLARIS[‡]

† $\Delta\Delta G_{bind}^{pH}$ (H63D)	5,6
† $\Delta\Delta G_{bind}^{pH}$ (Wt)	9,0
§ $\Delta\Delta G_{bind}^{mut}$ (7,5)	-0,9
§ $\Delta\Delta G_{bind}^{mut}$ (6,0)	-3,8

[‡] Todos los resultados en kcal/mol

[§] Representa el efecto de la mutación H63D sobre la energía libre de unión entre HFE y TfR1. ($\Delta G_{bind}^{HFE-H63D} - \Delta G_{bind}^{HFE-Wt}$)

[†] Representa el efecto de la variación del pH desde 7,5 a 6,0 sobre la energía libre de unión entre HFE (Wt & H63D) y TfR1. ($\Delta G_{bind}^{6,0(Wt)} - \Delta G_{bind}^{7,5(Wt)}$) ó ($\Delta G_{bind}^{6,0(H63D)} - \Delta G_{bind}^{7,5(H63D)}$)

3.5 Resumen y comparación de resultados

Como una forma de darle más sentido a los resultados anteriormente expuestos, se presentan en esta sección dos formas de compararlos: En la figura 8 se presentan dos gráficos que resumen los resultados obtenidos utilizando los tres métodos bioinformáticos descritos. El grafico 8A resume los resultados obtenidos para el efecto del paso de pH 7,5 a 6,0 sobre la interacción HFE/TfR1 con HFE-Wt y HFE-H63D. En este gráfico, se observa como los tres métodos bioinformáticos (SEM, FDPB y PDL/D/S) predicen una pérdida de estabilidad del complejo HFE/TfR1 cuando el pH pasa de 7,5 a 6,0; situación que se asemeja al lo observado *in-Vitro*, donde la afinidad entre HFE y TfR1 disminuyo drásticamente a pH 6,0 (Lebrón et al.1998-1999).

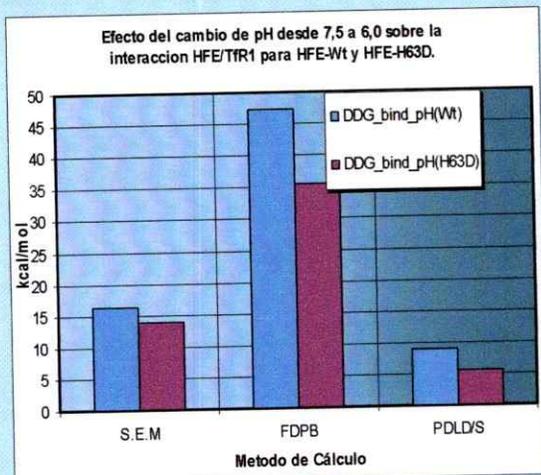
En la tabla 5 se puede observar además, que es el método PDL/D/S el que entrega un resultado mas cercano al valor obtenido *in-Vitro*, sin embargo los tres métodos siguen la misma tendencia por lo menos a nivel cualitativo. Cabe destacar que en el caso del efecto del cambio de pH sobre la interacción HFE-H63D/TfR1, los tres métodos predicen una pérdida de estabilidad que es menor a la obtenida para el wt, sin embargo estos datos no pudieron compararse con resultados *in-Vitro* pues no han sido realizados aún.

En la Figura 8B se presenta un gráfico similar al de la figura 8A, pero en esta ocasión se comparan los resultados obtenidos para el efecto de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1 a pH 7,5 y 6,0. Se observa en esta figura que los tres métodos utilizados predicen que la mutación aumenta la estabilidad del complejo HFE/TfR1, situación que es más notoria a pH 6,0.

Además en la tabla 5 se puede observar como los datos obtenidos por los métodos PDL/D/S y FDPB son similares a los datos obtenidos *in-Vitro* para el efecto de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1 (Lebrón et al. 1998-1999).

A modo de resumen podemos decir que a primera vista, los resultados bioinformáticos aquí expuestos, predicen el efecto del pH sobre la interacción HFE/TfR1 de manera similar a lo observado *in-Vitro*, dándole así validez a los demás resultados obtenidos en este trabajo. De modo más particular, se observa que el efecto de la mutación H63D de HFE también es reproducido de manera eficiente por los métodos bioinformáticos utilizados, respecto del valor *in-Vitro* disponible.

A)



B)

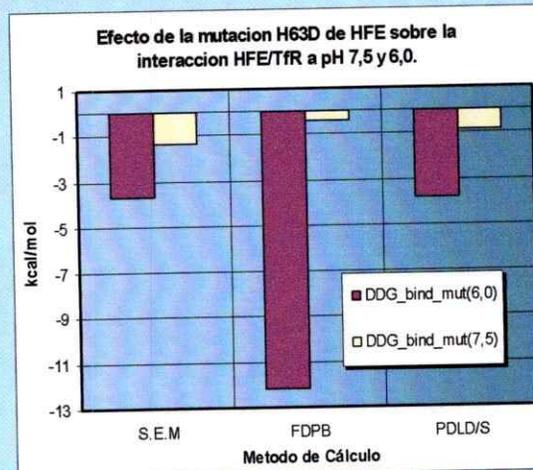


Fig. 8. Comparación de los resultados obtenidos mediante tres métodos de cálculo.

- A) En este grafico se comparan los resultados obtenidos utilizando los tres métodos bioinformáticos descritos en este trabajo, para el efecto sobre la interacción HFE/TfR1, del paso de pH 7,5 a 6,0.
- B) Comparación de los resultados obtenidos, con los tres métodos bioinformáticos descritos en este trabajo, para el efecto de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1 tanto a pH 7,5 y pH 6,0.

Tabla 5. Comparación entre los datos obtenidos *in-Vitro* por Lebrón et al. y los obtenidos en el presente trabajo utilizando tres métodos bioinformáticos para el efecto del cambio de pH de 7,5 a 6,0 y la presencia de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1.

Efecto del cambio de pH 7,5 a 6,0 sobre la interacción HFE/TfR1.

$\dagger \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ HFE-wt \ddagger (obs)	4,7 kcal/mol
$\dagger \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ HFE-wt £ (calc- PDLDS)	5,6 kcal/mol
$\dagger \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ HFE-wt £ (calc - FDPB)	47,1 kcal/mol
$\dagger \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ HFE-wt £ (calc SEM)	16,3 kcal/mol

Efecto de la mutación H63D de HFE sobre la interacción HFE/TfR1 a pH 7,5

$\text{§} \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ pH 7,5 \ddagger (obs)	- 0,7 kcal/mol
$\text{§} \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ pH 7,5 £ (calc - PDLDS)	- 0,9 kcal/mol
$\text{§} \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ pH 7,5 £ (calc - FDPB)	- 0,4 kcal/mol
$\text{§} \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ pH 7,5 £ (calc - SEM)	- 1,3 kcal/mol

$\dagger \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{pH}}$ Representa el cambio en la energía libre de unión entre HFE y TfR1 al cambiar el pH de 7,5 a 6,0

$\text{§} \Delta\Delta G_{\text{bind}}^{\text{mut}}$ Representa el cambio en la energía libre de unión entre HFE y TfR1 cuando HFE lleva la mutación H63D.

\ddagger (obs) Indica que los datos corresponden a observaciones *in-Vitro* realizadas por Lebrón et al. 1998-1999.

£ (calc) Indica que los datos fueron calculados utilizando alguno de los tres métodos descritos en este trabajo.

En el estudio de la homeostasis de Fe en humanos, y especialmente en los estudios concernientes a un tipo de desregulación de esta homeostásis, conocida como Hemocromatosis Hereditaria, el descubrimiento de HFE y la posterior caracterización de su interacción con el receptor 1 para Transferrina (TfR1) marcan un hito clave.

En primer lugar porque HFE resultó ser la proteína que estaba mutada en más del 80% de los casos de HH y porque su relación con TfR1 permitió relacionarla por primera vez con el metabolismo del Fe y así enfocar las investigaciones hacia la elucidación de su rol en la regulación, tanto de la absorción intestinal, como de la homeostasis de hierro en general (Feder et al. 1996; Bennet et al., 2000; Davies & Enns 2003).

En este contexto mucho se ha dicho acerca del rol de HFE y su interacción con TfR1 y diversas teorías se han generado al respecto.

Estas, favorecían en un inicio, la idea de que HFE cumplía su rol regulador directamente sobre TfR1, ya fuera compitiendo con (Fe)-Tf por la unión a TfR1 o modulando el reciclaje de TfR1 entre la membrana y los compartimentos endosomales (Feder et al, 1998; Roy & Enns, 1999; Roy & Enns, 2000). Investigaciones recientes, sin embargo, han entregado evidencias que permitían pensar en un rol más poli-funcional para HFE que diferiría según el tipo celular (epitelio intestinal, hígado, macrófagos) (Davis & Enns 2004). En este nuevo escenario, la interacción con TfR1 no era la función propiamente tal de HFE, sino que le servía como transporte desde la superficie celular hacia los compartimentos

endosomales. Este transporte, a su vez estaría mediado por las cantidades de TfR1 presentes en la superficie celular, que son un reflejo de las necesidades celulares (corporales) de Fe.

Entre estas evidencias se encontraba por ejemplo:

i) La observación de HFE unido a TfR1 dentro de los endosomas (pH 6,0) por algún tiempo permitiendo su co-localización en lisosomas si HFE llevaba un péptido señal que lo destinara a dicho compartimiento (LAMP) indicando que el pH endosomal no producía una disociación total del complejo (Davies et al, 2003).

ii) El hecho de que HFE soluble podía reproducir sólo algunas de las consecuencias de la expresión de HFE-Wt (Zhang et al., 2003; Davies et al., 2004).

iii) La observación en células Caco2 (células polarizadas utilizadas como modelo intestinal humano) que la sobre expresión de HFE producía un aumento de su presencia en el lado apical de la célula, situación que no se repetía cuando se sobre-expresaba el mutante H63D. (Arredondo et al., 2003-2004)

iv) La observación de que HFE tanto Wt como W81A (mutante incapaz de unirse a TfR1) eran capaces de inhibir la exportación de Fe desde células similares a enterocitos intestinales (HT29) en las cuales se observa una disminución en la expresión de **Hefastina** proteína encargada de oxidar el Fe cuando este es exportado del lado basolateral de la célula hacia la sangre. (Zhang et al., 2003; Davies et al., 2004)

Puesto que en nuestro laboratorio estamos centrados en el rol que ejerce HFE sobre la absorción intestinal de Fe, las investigaciones se concentraron en despejar las incógnitas sobre la función de HFE en la regulación de dicho proceso. Para lo cual se utilizaron como modelo, células polarizadas Caco2 que reproducen las características de un enterocito intestinal humano (sobre todo en cuanto a la absorción de Fe y expresión de $\beta 2m$, TfR1, DMT1, etc.).

Estas células fueron sometidas a sobre-expresión de HFE tanto Wt como H63D, que es una de las mutaciones conocidas de HFE que produce HH, pero cuyo efecto sobre la función de HFE no es aun claro. La sobre-expresión de HFE-Wt resultó en células incapaces de absorber Fe de forma normal que presentaron un fenotipo deficiente de Fe, con aumento en los niveles de TfR1 y disminución de los

niveles de Ft, además del incremento en la expresión de DMT1 sin aumentar por ello la absorción de hierro. Esta situación nos sugirió la posibilidad de que HFE interactuase de manera inhibitoria con DMT1.

Se observó además, un aumento de la presencia de HFE-Wt en la zona apical de las células respecto de los controles y la transcitosis de ésta desde el lado basolateral al apical, lo cual reforzó aun más la posible participación de HFE en la regulación de la absorción apical de Fe. Luego, al sobre-expresar el mutante H63D se obtuvo un fenotipo similar a los controles, indicando esto, que la proteína mutante no era funcional (pese a haber sido descrita anteriormente como correctamente plegada y capaz de llegar a la superficie celular basolateral; Lebrón et al., 1998-1999) y que las células respondían sólo con su HFE-Wt endógeno.

Los experimentos de destinación apical/basolateral realizados a las células que sobre-expresaban HFE-H63D mostraron una distribución similar a los controles en el lado apical y similar a la sobre-expresión de HFE-Wt en el lado basolateral, indicando que, a pesar de que los niveles de sobre-expresión eran similares en ambos casos (HFE-Wt y HFE-H63D), la proteína mutante era incapaz de llegar al lado apical y por lo tanto incapaz de regular a DMT1, por lo que dichas células presentaron un fenotipo similar a los controles.

Entonces, ¿cómo explicar la ausencia de HFE-H63D en el lado apical? Dados los conocimientos adquiridos sobre HFE, el mejor candidato a explorar en este caso fue la interacción HFE/TfR1 que, si bien se postula que no sería la interacción funcional primaria de HFE, si regula el tránsito de esta última, desde la membrana basolateral hacia el endosoma y sería además, la única interacción hasta hoy descrita para HFE.

Entonces, ¿podrá el efecto de la mutación H63D de HFE estar relacionado con la interacción HFE/TfR1? El objetivo de este trabajo fue buscar una respuesta para la pregunta anterior, y de esta manera intentar explicar los cambios en la distribución apical/basolateral de HFE-H63D mencionados anteriormente.

En este sentido el futuro de HFE (distribución al lado apical, etc.) está muy relacionado con la interacción HFE/TfR1, pues ésta, es la única interacción hasta ahora descrita para HFE y se produce durante la estadía de ambas moléculas en la superficie basolateral. Luego, juntas son endocitadas a los compartimentos endosomales.

Con el fin de responder a las preguntas antes mencionadas, se utilizaron técnicas bioinformáticas que nos permitieran calcular los cambios en la energía libre de unión entre HFE y TfR1, cuando HFE se encontraba en su forma silvestre (Wt) o con la mutación H63D.

Además, puesto que la interacción HFE/TfR1 es pH dependiente, disminuyendo su afinidad drásticamente al pH endosomal 6,0 respecto de la alta afinidad al pH extracelular 7,5; utilizamos los mismos métodos de cálculo para intentar predecir el efecto del pH sobre la energía libre de unión, puesto que si los cálculos predecían un comportamiento similar al observado experimentalmente, podríamos validar los resultados obtenidos, a pesar de no poseer sus contrapartes experimentales.

Si bien estamos hablando de energía libre de unión, es necesario mencionar que los métodos de cálculo utilizados consideran mayoritariamente la contribución o componente electrostática de dicha energía libre de unión, los resultados obtenidos son de carácter semi-cuantitativo y las energías obtenidas son

sólo relativas (solo aplicables a esta comparación entre HFE-Wt y HFE-H63D) y no valores absolutos. Sin embargo, la información que se obtiene sobre dicha componente electrostática de la energía de unión, es suficiente para inferir si cierta mutación aumenta o disminuye la energía libre de unión entre dos moléculas. Es la componente electrostática de dicha energía, la fuerza mayoritaria involucrada en el proceso de asociación, quedando prácticamente invariables las otras componentes (como las contribuciones entropicas) respecto de la contribución electrostática. Dichas contribuciones menores, se cancelaran mutuamente quedando el efecto de la mutación sobre la energía de interacción evidenciado sólo por la energía electrostática involucrada.

En cuanto al cambio de pH, se resolvió por mantener todos los residuos con las cargas correspondientes a pH 7,5 y sólo se cambió la carga de los residuos de Histidina, pues su pKa intrínseco es cercano a 6,0 y por lo tanto podría protonarse a dicho pH pasando de formal 0,0 a +1,0.

Los resultados obtenidos a partir de dichos cálculos, indican que la mutación H63D de HFE aumenta la estabilidad del complejo HFE(H63D)/TfR1 respecto del estado silvestre. Este aumento en la estabilidad del complejo es especialmente notorio al pH endosomal (6,0) y casi insignificante a pH 7,5.

Al observar los mapas de potencial electrostático podemos, por lo menos de manera cualitativa, entender el porqué de esa diferencia en estabilidad y su diferente valor a los dos pH's utilizados. HFE-wt a pH 7,5 posee en su superficie de interacción un potencial electrostático principalmente negativo (roja) el cual se complementa con el potencial electrostático positivo de la zona de interacción de TfR1 (azul). Al bajar el pH a 6,0 la superficie de interacción de HFE sufre una fuerte "neutralización" de las zonas que aparecían como más negativas a pH 7,5; mientras que la zona de interacción de TfR1 se hace aun más positiva, lo que podría indicar el porqué de la disociación del complejo al pH endosomal (6,0).

Sin embargo, al introducir la mutación H63D en HFE, se puede observar que aumenta el tamaño y la intensidad de la zona negativa de la superficie de interacción de HFE a pH 7,5, sobre todo alrededor del residuo 63(ASP).

Al cambiar el pH a 6,0 la neutralización observada para el wt es muchísimo menor y se mantiene aun un foco de cargas negativas cercano al residuo 63. Esto, junto al aumento en la positividad en la zona de interacción de TfR1, podría explicar porqué a ambos pH's hay un aumento en la estabilidad del complejo y porqué ésta, es más notoria a pH 6,0; ya que la mantención de la complementariedad electrostática entre HFE(H63D) y TfR1 sigue siendo notoria a este pH y lo es también a pH 7,5.

Cabe destacar, que los tres métodos de cálculo pudieron predecir una significativa pérdida de afinidad (aumento en la energía libre de unión) entre HFE (wt o H63D) y TfR1 al pasar de pH 7,5 a 6,0; con lo que se obtiene un control sobre la calidad de los cálculos. Sin embargo, los valores obtenidos para los $\Delta\Delta G$ de unión producto de la mutación H63D son en ambos pH's bastante pequeños (- 3,68 kcal/mol a pH 6,0 y - 0,89 a pH 7,5 kcal/mol en PDL/D/S) lo que podría interpretarse como valores termodinámicamente insignificantes, pero, según se ha establecido, valores de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ mayores o iguales a -2 kcal/mol, son suficientes para considerar que una mutación puntual tiene un efecto significativo sobre la estabilidad del complejo (Wells & DeVos, 1996).

Los resultados aquí expuestos, indican que la mutación H63D de HFE aumenta la estabilidad del complejo HFE-TfR1, situación que se hace más notoria al pH endosomal (6,0). Lo anterior resultaría en una disminución en la tasa de disociación del complejo una vez en el endosoma, aumentando el reciclaje de HFE a la superficie celular (basolateral) junto a TfR1 impidiendo, por la disminución de la disponibilidad de HFE libre, la(s) función(es) de HFE.

En el caso de las células intestinales (polarizadas), dicha función sería la inhibición del transportador DMT1 ya sea en el endosoma, evitando que este entregue Fe hacia el citosol, o en la región apical de las células donde regularía el la captación de Fe desde el lumen intestinal (llegando allí por medios de trafico aun por describir).

Sin embargo, a pesar de lo favorables que aparecen los resultados obtenidos con técnicas bioinformáticas, en cuanto a su capacidad de explicar resultados obtenidos por nuestro grupo anteriormente, estos poseen aun una alta carga de incertezas que provienen de factores tanto intrínsecos de los métodos utilizados, como de nuestra habilidad para generar parámetros que nos entreguen un buen modelo. Por ejemplo, para el caso del método PDL/D/S, la limitación en el número de átomos que se pueden incluir en la Región I nos obligó a representar a TfR1 como un ligando muy pequeño que se une a HFE, con lo cual se podría estar pasando por alto alguna otra interacción que no cupo en la Región I del sistema generado. De manera más general, es decir, para todos los métodos utilizados, esta el problema del pH, pues entre 6,0 y 7,5 sólo cabía la posibilidad de que hubiese un cambio del estado de protonación en los residuos de His, pero esto en el caso de que dichos residuos estuviesen en agua y aislados de la proteína. En cambio, dentro de las proteínas, los grupos ionizables pueden sufrir cambios en sus pKa's debido a sus interacciones con residuos cercanos y su nivel de exposición al solvente. El problema, radica en el cálculo de estos ΔpKa que requieren un tratamiento previo a la realización de otros cálculos y más aun, presentan su propia carga de errores en su determinación. Quizás se puede decir en este sentido, que nuestra metodología en cuanto al cambio de pH fue bastante simple. Una situación que quizás debimos considerar es el cambio en el estado de ionización sólo en el residuo 63, cuando este es His y no tocar las demás Histidinas de HFE o TfR1 que pueden tener un comportamiento diferente. Sin embargo, puesto que los métodos utilizados fueron capaces de predecir correctamente la

perdida de afinidad entre HFE y TfR1 al pasar de pH 7,5 a 6,0; creemos que nuestros resultados son, si bien perfectibles y refinables, suficientemente robustos para responder a las preguntas aquí planteadas y abren una serie de nuevas oportunidades de experimentación.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se buscó una forma de encontrar una explicación a ciertos resultados obtenidos en el laboratorio del Hierro y Biología del Envejecimiento utilizando técnicas bioinformáticas. Los experimentos antes mencionados buscaban determinar si al sobre-expresar HFE en su forma silvestre o en la forma que lleva la mutación H63D en células Caco-2 se producían cambios en la distribución apical/basolateral de HFE, TfR1, DMT1 o β 2m (la chaperona de HFE).

Los resultados obtenidos mostraron que la sobre-expresión de la forma silvestre de HFE producía un aumento de la presencia de esta proteína en la zona apical, efecto que fue corroborado por el incremento en los niveles de β 2m en la zona apical pese a que esta última no fue sobre-expresada. Luego, al sobre-expresar el mutante de HFE, H63D, se observó que pese a que el nivel de sobre-expresión era similar al utilizado para HFE-Wt, no había en este caso un aumento de su presencia en el lado apical, así como tampoco aumentó el nivel de β 2m en la misma zona. Todo lo anterior, nos llevo a preguntarnos cual sería el porqué de dicha diferencia en la distribución apical/basolateral entre ambas formas de HFE. De ese modo, generamos nuestra hipótesis de trabajo, en la que el principal candidato para producir los cambios de distribución de HFE, dado que lleva la mutación H63D, sería la interacción HFE/TfR1 que es hasta ahora la única interacción conocida de HFE. En este sentido, nuestros estudios computacionales se centraron en describir dicha interacción y el efecto que la mutación H63D podría tener sobre ésta, como forma de explicar los resultados antes obtenidos.

Los estudios bioinformáticos realizados para la comprobación de esta hipótesis, que dan forma a este trabajo, fueron cálculos de energías libres de unión como método de medición de la afinidad o estabilidad de la interacción entre HFE y TfR1, tanto al variar entre HFE-Wt y HFE-H63D, como al

pasar de pH 7,5 a pH 6,0 pues esta interacción es pH dependiente (perdiendo afinidad a pH 6,0) y los pH's utilizados corresponden al pH extracelular y endosomal respectivamente. Los resultados obtenidos al utilizar 3 métodos diferentes de cálculo, indican que la mutación H63D de HFE aumenta la estabilidad del complejo, situación que es especialmente notoria al pH endosomal (6,0). Esta situación resultaría entonces en una disminución de la probabilidad de que HFE-H63D se disocie de TfR1 en los endosomas y pueda traficar hacia la zona apical de la célula donde ejercería su función. De esta manera podemos decir entonces, que los resultados obtenidos mediante el calculo computacional de las energías libres de unión para la interacción HFE(Wt o H63D)/TfR1 permiten explicar el porqué de las diferencias en la distribución apical/basolateral de HFE-Wt y HFE-H63D, comprobando así nuestra hipótesis, que proponía que la interacción HFE/TfR1 controla el destino post-endosomal de HFE o la proporción de esta ultima que puede traficar hacia otras zonas de la célula donde cumplir su aún esquiiva función. Podemos entonces decir que con los resultados experimentales que dan origen a la Hipótesis presentada y la posterior explicación de dichos resultados (e hipótesis) mediante métodos bioinformáticos, damos un paso adelante en la dilucidación del efecto de la mutación H63D sobre la función normal de HFE, pudiendo entregar pruebas que dan cuenta que HFE es una proteína multifuncional dentro de lo que es la regulación de la absorción intestinal de hierro.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aisen, P and Brown, E. (1980) Structure and Function of transferrin. *Progress in Hematology*. Vol VIII: 25-58.

Andrews, N., Fleming, M. and Gunshin, H. (1999) Iron transport across biologic membranes. *Nutr. Rev.* 57(4): 114-123.

Araya-Secchi, R., Arredondo, M., Aguirre, P., Tapia, V., Reyes, F., Mura, C.V., Núñez, M.T. (2004) HFE with the H63D Mutation: Loss of Function Associated with Inability to Reach the Apical Membrane of Intestinal epithelial (Caco-2) Cells. (En proceso de publicación).

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C.V., Mazariegos, D.I., Núñez, M.T (2003) HFE-H63D does not Inhibit Apical Iron Uptake in intestinal epithelial (Caco-2) Cells. (En proceso de publicación)

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C.V., Núñez, M.T. (2001) HFE is a Negative Modulator of Apical iron Uptake by intestinal epithelial (Caco-2) Cells. *FASEB J.* 15:1276-1278.

Barton, J., Sawada-Hirai, R., Rothenberg, B., Acton, R. (1999) Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S63C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol. Dis.* 25: 147-55.

Bennet, M.J., Lebrón, J.A., Bjorkman, P.J. (2000) Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature.* 403:46-53.

Brown, E., Dubach, R. and Moore, C. (1958) Studies in iron transportation and metabolism. XI. Critical analysis of mucosal block by large doses of inorganic iron in human subjects. *J. Lab & Clin. Med.* 52(3): 335-55.

Bruccoleri, R.E., Novotny, J., Davis, M.E., Sharp, K.A. (1997) Finite Difference Poisson-Boltzmann Electrostatic Calculations: Increased Accuracy Achieved by Harmonic dielectric Smoothing and Charge Antialiasing. *J. Comp. Chem.* 18(2):268-276.

Canonne-Hergoux, F., Zhang, A., Ponka, P., Gros, P. (2001) Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT2) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood.* 98(13): 3823-30.

Cazzola, M. and Skoda, R. (2000) Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood.* 95: 3280-3288.

Davies, P.S., Enns, C.A. (2004) Expression of the Hereditary Hemochromatosis Protein HFE Increases Ferritin Levels by Inhibiting Iron Export in HT29 Cells. *J. Biol. Chem.* 279(24):25085-25092.

Carlson H, Zhang AS, Fleming WH, Enns CA. (2004) The hereditary hemochromatosis protein, HFE, lowers intracellular iron levels independently of transferrin receptor 1 in TRVB cells. *Blood*. Nov 4 (e-pub ahead of print)

Crichton, R. and Ward, R. (1991) Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption. *Blood*. 22: 406-15.

Davies, P.S., Zhang, A.S., Anderson, E.L., Roy, C.N., Lampson, M.A., McGraw, T.E., Enns, C.A. (2003) Evidence for the interaction of the hereditary haemochromatosis protein HFE, with the transferrin receptor in endocytic compartments. *Biochem J*. 373:145-153.

Davies PS., Enns, C. (2004) Expression of the hereditary hemochromatosis protein HFE increases ferritin levels by inhibiting iron export in HT29 cells. *J. Biol. Chem*. 279(24): 25085-92.

Dix, D., Lin, P., McKenzie, A., Walden, W., Theil, E. (1993) The influence of the base-paired flanking region on structure and function of the ferritin mRNA iron regulatory element. *J. Mol. Biol*. 231(2): 230-40.

Emery-Goodman, A., Hirling, H., Scarpelino, L. (1993) Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between the RNA-binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase. *Nucleic Acid Res*. 21(6):1457-61.

Enns, C.A. (2001) Pumping iron: the strange partnership of the hemochromatosis protein, a class I MHC homolog with the transferrin receptor. *Traffic*. 2:167-174. (Review)

Feder, J., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. and Basava, A. (1996) A novel MHC class I -like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*. 13:399-408.

Feder, J.N., Penny, D.M., Irniki, A., Lee, V.K., Lebrón, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., Schatzman, R.C. (1998) The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lower its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:1472-1477.

Felliti, VJ. And Beutler, E. (1999) New developments in hereditary hemochromatosis. *Am. J. Med. Sci*. 318: 257-268.

Ferguson, C., Wareing, M., Wacol, D., Green, R., Smith, C., Riccardi, D. (2001) Cellular localization of divalent metal transport DMT1 in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 280(5): F803-14.

Flanagan, P. (1989) Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta. Pediatr. Scand. Suppl*. 361:21-30.

Fleming, MD., Romano, MA., Su, MA., Garrick, LM. Garrick, MD., Andrews, NC. (1998) Nramp2 is mutated in the anemia Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 1148-1153.

- Fleming, MD., Migas, MC., Zhou, XY., Jiang, J., Britton, RS., Brunt, EM., Tomatsu, S., Waheed, A., Bacon, BR. And Sly, WS. (1999) Mechanisms of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3143-3148.
- Fleming, R.E., Sly, W.S. (2001) Heparin a putative iron-regulator hormone related to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 98(15):8160-8162.
- Fleming, R. and Sly, W. (2002) Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev. Physiol.* 64:663-80.
- Ganz, T. (2004) Heparin in iron metabolism. *Curr.Opin.Hematol.* 11(4):251-254. (Review)
- Goosen, B., Caughman, S., Harford, J., Klaunser, R., Hentze, M. (1990) Translational repression by a complex between the iron-responsive element of ferritin mRNA and its specific cytoplasmic binding protein is position-dependent in vivo. *EMBO J.* 9:4127-33.
- Gray, N. and Hentze, M. (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNA. *EMBO J.* 13:3882-91.
- Griffiths, W., Sly, W., Cox, T. (2001) Intestinal iron uptake determined by divalent metal transporter is enhanced in HFE-deficient mice with hemochromatosis. *Gastroenterology* 122:646-651
- Gross, C.N., Irrinki, A., Feder, J.N., 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. *J. Biol. Chem.* 273:22068-22074.
- Gruenheid, S., Canone-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackman, D., Grinstein, S., Gross, P. (1999) The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* 189: 831-841.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, MF., Boron, WF., Nussberger, S., Gollan, JL., Hedigen, MA. (1997) Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal ion transporter. *Nature.* 388:482-488.
- Hanson, E.H., Imperatore, G., Burke, W. (2001) HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review (Review) *Am. J. Epidemiol.* 154(3):193-206.
- Haile, D., Roault, T., Tang, C., Chin, J., Harford, J. (1992) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron responsive element binding protein. Role of the iron-sulfur cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(16):7536-40.
- Kühn, L. and Hentze, M. (1992) Coordination of cellular iron metabolism by post-transcriptional gene regulation. *J. Inorg. Biochem.* 47(3-4): 183-95.

- Laham, N., Rotem-Yehudar, R., Shechter, C., Coligan, J.E., Ehrlich, R. (2004) Transferrin Receptor Association and Endosomal Localization of Soluble HFE Are not Sufficient for Regulation of Cellular Iron Homeostasis. *J. Cell. Biochem.* 91:1130-1145.
- Lawrence, C.M, Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D.W., Harrison, S.C. (1999) Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. *Science* 286:779-782.
- Leibold, E. and Guo, B. (1992) Iron-dependent regulation of ferritin and transferrin receptor expression by the iron-responsive element binding protein. *Ann. Rev. Nutr.* 12:345-68.
- Lebrón, 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* 93:111-123.
- Lebrón, J.A., Bjorkman, P.J. (1999) The Transferrin Receptor Binding Site on HFE, the Class I MHC-related Protein Mutated in Hereditary Hemochromatosis. *J. Mol. Biol.* 289:1109-1118.
- Lebrón, J.A., West, A.P., Jr., Bjorkman, P.J. (1999) The Hemochromatosis Protein HFE Competes with Transferrin Receptor for Binding to the Transferrin Receptor. *J. Mol. Biol.* 294:239-245.
- Lebrón, J.A., Bennet, M.J., Bjorkman, P.J. (2000) Crystal Structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with the transferrin receptor. *Nature* 403:46-53
- Lee, F.S., Chu, Z.T., Warshel, A. (1993) Microscopic and Semimicroscopic calculations of electrostatic energies in proteins by the POLARIS and ENZYMIK programs. *J. Comp. Chem.* 14(2):161-185.
- 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.
- Muegge, I., Schweins, T., Warshel, A. (1998) Electrostatic Contributions to Protein-Protein Binding Affinities: Application to Rap/Raf Interactions. *Proteins* 30:407-423.
- Mura, C., Raguene, O., Ferec, C. (1999) HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implications in mild form of hemochromatosis. *Blood.* 93: 2505-15.
- Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S. (2002) Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cell. Mol. Dis.* 29(3):327-335.
- Núñez, M.T., Tapia, V. and Arredondo, M. (1996) Intestinal epithelia (Caco2) cells acquire iron through the basolateral endocytosis of transferrin. *J. Nutr.* 126: 2151-2158.
- Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R., Bacon, B., Zhou, X., Tomatsu, S., Fleming, R. and Sly, W. (1997a) Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13198-13202.
- Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R., Feder, J., Tsuchihashi, Z., Schatzman, R.C., Bacon, B.R. and Sly, W. (1997b) Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary

- hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2534-2539.
- Pietrangelo, A. (2002) Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. (Review) *Am. J. Physiol (Gastrointest Liver Physiol).* 282:G403-G414.
- Pietrangelo, A. (2004) Hereditary Hemochromatosis – A New Look at an Old Disease (Review). *N. Engl. J. Med.* 350:2383-2397.
- Piperno, A., Arosio, C., Fossati, L., Vigano, M., Trombini, P. et al. (2000) Two novel nonsense mutations of HFE gene in five unrelated Italian patients with hemochromatosis. *Gastroenterology.* 119: 441-45.
- Pointon, J., Wallace, D., Merryweather-Clarke, A., Robson, K. (2000) Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. *Genet. Test.* 4: 151-61.
- Roy, C.N., Penny, D.M, Feder, J.N., Enns, C.A. (1999) The Hereditary Hemochromatosis Protein, HFE, Specifically Regulates Transferrin-mediated Iron Uptake in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* 274(13):9022-9028.
- Roy, C. and Enns, C. (2000) Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood.* 96: 4020-4027.
- Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Roault, T., Klaunser, R. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein. Iron regulatory protein 2. *J. Biol. Chem.* 269:30904-30910.
- Santos, M., Schilham, M., Rademarkers, L., Marx, J., Sousa, M. and Clevers, H. (1996) Defective iron homeostasis in b2-Microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J. Exp. Med.* 184: 1975-1985.
- Schutz, C.N., Warshel, A. (2001) What Are the Dielectric “Constants” of Proteins and How to Validate Electrostatic Models? (Review) *Proteins* 44:400-417.
- Sharp, K.A. (1998) Calculation of HyHel10-Lysozyme Binding Free Energy Changes: Effect of Ten Point Mutations. *Proteins* 33:39-48.
- Sheinerman, F.B., Norel, R., Honig, B. (2000) Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Curr. Op. Struc. Biol.* 10:153-159.
- Theil, E. (1993) The IRE (iron regulatory element) family: structures which regulate mRNA translation or stability. *Biofactors.* 4(2): 87-93.
- Trinder, D., Oates, P.S., Sadleir, C.T. and Morgan, E.H. (2000) Localization of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut.* 46: 270-276.
- Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X., Tomatsu, S. and Feder, J. (1997) Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with b2-microglobulin, intracellular processing,

and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12384-12389.

Waheed, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Fleming, R., Zhou, X. (1999) Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1579-1584.

Wallace, D., Doodley, J., Walker, A. (1999) A novel mutation of HFE explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. *Gastroenterology.* 116: 1409-12.

Weinberg, D.E. (1989) Cellular regulation of iron assimilation. *The quarterly review of biology.* 64:261-90.

Williams, K., Willson, MA., Bressler, J. (2000) Regulation and developmental expression of the divalent metal ion transporter in the rat brain. *Cell Mol. Biol.* 46(3): 563-71.

Zhang AS., Davies, PS., Carlson HL., Enns CA. (2003) Mechanisms of HFE-induced regulation of iron homeostasis: Insights from the W81A HFE mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(16): 9500-5.