

UCH-FC
Biotecnología
R934
c.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Efecto de Hepcidina en la redistribución de los transportadores de hierro DMT1 y Ferroportina en Células Caco-2”

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

ÁLVARO RODRIGO RUIZ FERNÁNDEZ

Dr. Marco Tulio Nuñez G.
Director del Seminario de Título:

Agosto de 2011
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Alvaro Rodrigo Ruiz Fernández**

Efecto de Hepcidina en la redistribución de los transportadores de hierro DMT1 y Ferroportina en Células Caco-2”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Director Seminario de Título

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

Comisión de Evaluación

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Presidente Comisión

A black ink handwritten signature of Alejandro Roth Metcalfe, written over a horizontal line.

Dr. Christian González-Billault
Evaluador

A black ink handwritten signature of Christian González-Billault, written over a horizontal line.



Santiago de Chile, junio de 2011



Mi nombre es Álvaro Ruiz, nací en Santiago el 12 de marzo de 1983, estudié en el colegio Latino Americano de Integración.

ÍNDICE DE MATERIAS

| | |
|---|-----------|
| 1. LISTA DE FIGURAS. | 5 |
| 2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS. | 6 |
| 3. RESUMEN. | 8 |
| 4. INTRODUCCIÓN. | 10 |
| 4.1 Antecedentes Bibliográficos. | 10 |
| 4.2 Hipótesis de Trabajo. | 24 |
| 4.3 Objetivo General. | 24 |
| 4.4 Objetivos Específicos. | 24 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS. | 26 |
| 5.1. Materiales. | 26 |
| 5.1.1. Materiales y reactivos generales. | 26 |
| 5.1.2. Anticuerpos e Inmunodetección. | 28 |
| 5.1.3 Materiales de cultivo. | 28 |
| 5.1.4. Células. | 29 |
| 5.1.5. Equipos. | 30 |
| 5.2. Métodos. | 31 |
| 5.2.1 Cultivo Celular. | 31 |
| 5.2.2. Marcaje de Hepc con ¹³¹ I. | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.3. Obtención de una preparación de Hepc parcialmente purificada. | 32 |
| 5.2.4 Cuantificación del Fe en los medios de cultivo. | 32 |
| 5.2.5. Determinación de las características de migración electroforética de Hepc-25 marcada con ¹³¹ I. | 33 |
| 5.2.6 Biotinilación selectiva de las membranas apical o basolateral de células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales. | 34 |
| 5.2.7. Inmuno-blot para DMT1 y FPN. | 35 |
| 5.2.8. Efecto de la concentración de hierro en el medio en la distribución de DMT1 y FPN. | 36 |
| 5.2.9. Efecto de Hepc en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2. | 36 |
| 5.2.10. Efecto de Hepc en la incorporación de Fe por Caco-2. | 37 |
| 5.2.11. Análisis estadístico. | 37 |
| | |
| 6. RESULTADOS | 38 |
| 6.1. Obtención y purificación parcial de Hepc a partir de medios condicionados de células Hep-G2. | 38 |
| 6.1.1. Obtención y purificación parcial de Hepc nativa. | 38 |
| 6.1.2. Determinación de las características de migración electroforética de Hepc-25 marcada con ¹³¹ I. | 39 |
| 6.2. Caracterización de Hepc PP en la incorporación apical de ⁵⁵ Fe. | 41 |
| 6.3. Efecto del Fe en la redistribución de DMT1 y de FPN en Caco-2. | 42 |
| 6.4. Efecto de Hepc en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2. | 45 |

| | |
|---|----|
| 7. DISCUSIÓN. | 46 |
| 7.1 Actividad de Hepc parcialmente purificada. | 46 |
| 7.2. Efecto del Fe en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2. | 47 |
| 7.3. Efecto de Hepc en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2. | 48 |
| 7.4. Migración de Hepc-25 marcada con ¹³¹ I bajo distintas condiciones. | 49 |
| | |
| 8. RESUMEN. | 51 |
| | |
| 9. CONCLUSIONES. | 52 |
| | |
| 10. REFERENCIAS. | 53 |

1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema IRE/IRP.

Figura 2: Metabolismo de Tf-2Fe⁺³.

Figura 3: Transporte de Fe inorgánico en enterocitos.

Figura 4: Secuencia aminoacídica y modelo de estructura de Hefc.

Figura 5: Mecanismo propuesto de acción de Hefc.

Figura 6: Caracterización de la migración electroforética de Hefc.

Figura 7: Incorporación de Fe⁵⁵ en células Caco-2.

Figura 8: Efecto del Fe sobre DMT1.

Figura 9: Efecto del Fe sobre FPN.

Figura 10: Efecto de Hefc sobre DMT1 y FPN.

Figura 11: Mecanismo de acción de Hefc sobre enterocitos.

2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- aa : Aminoácidos.
- BCA : Ácido Bicinconínico.
- BSA : Albúmina sérica de bovino.
- Caco-2 : Línea celular de carcinoma de colon humano.
- Dcytb : Citocromo b duodenal.
- DMEM : Medio esencial modificado Dulbecco`s.
- DMT1 : Transportador de metales divalentes.
- EDTA : Ácido etilendiaminotetracético.
- FBS : Suero bovino fetal.
- Fe : Hierro.
- FPN : Ferroportina.
- Hep-G2 : Línea celular de carcinoma hepático humano.
- Hepsidina : Heps.
- Hepsidina-25 : Heps sintética de 25 aminoácidos.
- Hepsidina-25-¹³¹I : Heps sintética de 25 aminoácidos marcada con yodo 131.
- HFE : Proteína de la hemacromatosis.
- HJV : Haemo juvelina.
- hr : Hora.
- ¹³¹I : yodo 131.
- IgG : Inmunoglobulina G.
- IRE : Elemento que responde a hierro.
- IRP : Proteína reguladora de hierro.

- k : Constante de velocidad de reacción.
- LIP : Pool de hierro lábil.
- min : minutos.
- MEM : Medio escensial mínimo.
- PP : Parcialmente purificada.
- PBS : Solución tampón de fosfato salino.
- ROS : Especies reactivas del oxígeno.
- Rtf : Receptor de transferrina.
- SOD : Super óxido dismutasa.
- TEER : Resistencia eléctrica trans epitelial.
- Tf : Transferrina.
- Tween 20 : Polioxietilensorbitan monolaurato.
- UI : Unidad internacional.
- UTR : Región no traducida.

3. RESUMEN

La importancia biológica del hierro acoplada a su inherente toxicidad, obliga a la existencia de mecanismos que regulen finamente los niveles de hierro celular y corporal. Recientemente se ha descrito en mamíferos que el péptido Hepsidina (Hepc) funciona como el modulador maestro de la homeostasis corporal del hierro. Hepc, cuya síntesis en el hígado aumenta en respuesta a un incremento del hierro corporal, disminuye los niveles de hierro circulante inhibiendo su liberación desde enterocitos, macrófagos y hepatocitos.

En este trabajo se buscó esclarecer el efecto de Hepc sobre los niveles y distribución de las proteínas transportadoras de hierro: Ferroportina (FPN) y el transportador de metales divalentes (DMT1) en las membranas apical y basolateral de células Caco-2 polarizadas, las cuales son utilizadas como modelo de epitelio intestinal. También se caracterizó la migración electroforética de Hepc. Para cumplir el objetivo de determinar el efecto de Hepc, se estableció un método de purificación parcial de Hepc nativa a partir de medios condicionados de células Hep-G2. Dicha Hepc fue utilizada para tratar células Caco-2. Al exponer células Caco-2 a un aumento en la oferta de hierro se observó una disminución en los niveles de DMT1 presentes en la membrana apical y un aumento en la membrana basolateral. Este tratamiento no modificó los niveles de FPN. El tratamiento de las células Caco-2 con Hepc nativa por 12 horas (hr) produjo una disminución en la incorporación apical de hierro e indujo cambios en los niveles de DMT1 presentes en la membrana apical, sin modificar la ubicación de DMT1 en la membrana basolateral o la distribución apical o basolateral de FPN. La disminución de DMT1 en la membrana apical permite explicar la disminución de la incorporación de Fe

inducida por Heps y podría ser parte del mecanismo por el que Heps inhibe la salida de hierro en enterocitos.

SUMMARY

Iron's biological relevance, coupled to its inherent toxicity, has forced living systems to develop systems that finely regulate both cellular and body iron levels. Hepcidin (Heps) is a peptide that has been recently described as a master modulator of body iron homeostasis. Increased levels of iron induce Hepcidin (Heps) production by the liver, which leads to a reduction in circulating iron levels through inhibition of iron release from enterocytes, macrophages and hepatocytes.

We seek to determine the effect of Heps on the protein levels and distribution of the iron transporters DMT1 and FPN present in the apical and basolateral membranes of polarized Caco-2 cells, which we use as a model of intestinal epithelium. We also characterized the electroforetic migration of Heps. To this end, we established a method for the partial purification of native Heps from conditioned mediums of Hep-G2 cells. We found that an increase in iron supply result in decreased levels of DMT1 at the apical membrane and a increased levels in the basolateral membranes, while FPN distribution were not altered. Caco-2 cells treated for 12 hours with native Heps present a significant decrease of apical iron incorporation and decreased DMT1 levels at apical membranes, but not in the basolateral domain. Heps treatment does not change the apical - basolateral localization of FPN. The decrease of DMT1 in the apical membrane induced by Heps suggest that the decreases apical iron uptake in enterocytes treated with Heps, and could be the mechanism through which Heps decreases the iron release into the plasma by enterocytes.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Antecedentes Bibliográficos

El hierro en los sistemas biológicos

El hierro fue un elemento central en el origen de la vida. Dado su bajo potencial redox, facilitó el flujo de electrones en diversas reacciones que colaboraron en la formación de las primeras moléculas orgánicas. En la actualidad, el hierro juega un rol esencial en los sistemas biológicos siendo imposible concebir la vida como la conocemos sin este elemento.

El FeS habría sido el primer donador de electrones, actuando como agente reductor para permitir la fijación de CO₂. Esta reacción genera entre otros productos el FeS₂, precipitado conocido como pirita, la cual formó una superficie positiva sobre las rocas donde los aniones orgánicos de baja solubilidad, productos también de la fijación del CO₂, se pudieron mantener adheridos con movilidad, catalizándose así la formación de macromoléculas por mantener en 2 dimensiones las posibilidades de encuentro. Por lo anterior la pirita habría cumplido un rol pre-enzimático, un ejemplo es la síntesis del ácido succínico (Wachtershauser, 1988). Dado este rol pre-enzimático tanto del FeS como del FeS₂, no es de extrañar que las primeras enzimas hayan estado asociadas a hierro. Esta importancia del hierro en el origen de la vida se proyectó en el desarrollo de la misma explicando en parte la importancia actual del hierro en los organismos de hoy, formando parte esencial en las enzimas del ciclo de Krebs, en la respiración celular, en

los transportadores de electrones en los citocromos y en numerosas enzimas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular, tales como las catalasas, peroxidases y oxigenasas (Andrews, 2005).

El hierro como catalizador de ROS

Pero el hierro además de entregarnos vida nos la quita, ya que este elemento, mediante el conjunto de reacciones denominadas de Haber-Weiss y Fenton, es una fuente significativa de especies reactivas del oxígeno (Muckenthaler et al., 2008) las que provocan daño celular a través de la oxidación de macromoléculas como el DNA, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (Chevion, 1988),(Keyer and Imlay, 1996) y (Lesko et al., 1980).

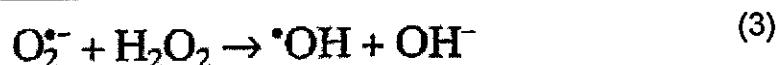
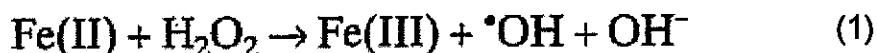
La reacción de Fenton (**ecuación 1**) es una fuente de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en la que participa el hierro u otros metales de transición en estado reducido como el Cu^{+1} (Goldstein et al., 1993).



Pero esta reacción por si sola no supone una fuente constante de $\cdot\text{OH}$ ya que el Fe^{+2} se va a agotando, por pasar a ser Fe^{+3} . Sin embargo el Fe^{+3} puede volver a su estado Fe^{+2} al ser objeto de reducción por el superóxido (**ecuación 2**) (Barb et al., 1951).



Si consideramos las dos reacciones anteriores obtenemos la reacción de Haber-Weiss (ecuación 3) (Haber and Willstatter, 1931) y (Weiss, 1935).



Del esquema anterior se estableció que la reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro es la fuente celular de $\cdot\text{OH}$. El $\cdot\text{OH}$ es una molécula altamente inestable, la que genera daño general y acumulable en la célula al modificar macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN, eventos que se relacionan directamente con el envejecimiento y con diversas enfermedades como hemacromatosis hereditaria, Parkinson, Alzheimer y Esclerosis Lateral Amiotrófica (Toyokuni, 2002),(Sayre et al., 2000),(Perry et al., 2002) y (Sayre et al., 2005).

Los seres vivos han desarrollado un eficiente método de captación de hierro, mas no de excreción, lo cual conlleva una acumulación de hierro en el organismo a lo largo del tiempo (Bartzokis et al., 2004),(Hallgren and Sourander, 1958) y (Bartzokis et al., 1997). Esta incapacidad de desechar el exceso de hierro condiciona a que los defectos genéticos que aumenten la absorción de hierro sean altamente dañinos. Entre estas enfermedades destaca la ya mencionada Hemacromatosis Hereditaria, la enfermedad genética de mayor incidencia en la población caucásica, relacionada con patologías como hepatopatía crónica, cirrosis hepática, cáncer de hígado, diabetes sacarina,

insuficiencia cardiaca debida a miocardiopatías, artritis, impotencia secundaria, e hipogonadismo hipotalámico (Nicolas et al., 2003),(Fowler, 2008) y (Lawless et al., 2008) (Pietrangelo, 2007). Considerando lo anterior, resulta importante comprender los mecanismos subyacentes a la homeostasis corporal y celular del hierro, ya que pueden sentar las bases para futuras terapias de enfermedades relacionadas con la desregulación homeostática del Fe.

De lo anteriormente expuesto, surge la noción de la dicotomía del hierro en los sistemas vivos, de ser a la vez esencial y altamente tóxico. Para asegurar la viabilidad celular, la homeostasis del hierro es modulada por una compleja red de transportadores, moléculas de almacenamiento y moléculas que regulan su absorción y reciclaje (Miret et al., 2003).

Homeostasis intracelular de hierro - regulación traduccional

La homeostasis celular del hierro resulta de la acción coordinada de múltiples proteínas como el receptor para transferrina (RTf), el transportador de entrada de hierro DMT1 (SLC11A1), el transportador de salida de hierro FPN (SLC40A1) y la proteína de almacenaje de hierro Ferritina (Ft) (Hofto et al., 2008).

La principal entrada del hierro inorgánico a las células ocurre a través del transportador de metales divalentes DMT1, que como su nombre lo indica transporta metales con carga +2. Existen cuatro isoformas de DMT1: 1A+IRE, 1A-IRE, 1B+IRE y 1B-IRE. Estas isoformas, codificadas en el gen *dmt1*, se generan por medio de empalme

alternativo de los exones del extremo 5', exones 1A o 1B, y exones del extremo 3', exón 16, que contiene un elemento de respuesta a hierro (+IRE) o exón 17 que no lo contiene (-IRE) (Hubert and Hentze, 2002). DMT1 se expresa en todos los tipos celulares. Es abundante en los enterocitos (Fleming et al., 1997) y en ciertas regiones del cerebro (Gunshin et al., 1997). La relevancia de DMT1 ha sido demostrada tras estudios genéticos en ratas con el locus DMT1 mutado, las que presentan anemia microcítica e hipocrómica severa por baja absorción intestinal de hierro y problemas en la captación del metal en tejidos periféricos (Fleming et al., 1998).

La salida de hierro desde la célula es mediada por el transportador FPN. FPN es una proteína de 62 KDa con 9 a 10 segmentos de transmembrana predichos (Donovan et al., 2000). Su ARNm contiene una secuencia IRE en la región no traducida 5' (5'UTR). FPN se expresa principalmente en el hígado, riñón, placenta, duodeno y bazo, (Abboud and Haile, 2000). Si bien es de común acuerdo que FPN se expresa solo en la membrana basolateral de los enterocitos (McKie et al., 2000), evidencias recientes en la literatura (Thomas and Oates, 2004) y de nuestro laboratorio establecen que también se expresa en la membrana apical, lo que establece un posible mecanismo de desecho de hierro previamente desconocido (Nunez et al., 2010). Recientemente, se ha postulado que FPN funciona como modulador de la actividad de DMT1, esto porque al agregar un anticuerpo contra FPN al medio apical de células Caco-2 baja la incorporación de hierro desde la zona apical (Thomas and Oates, 2004).

Una vez que la célula ha incorporado al hierro, este pasa a formar parte del pool de hierro lábil citosólico (LIP), este hierro libre es regulado por modificación de la

expresión de las proteínas que transportan, almacenan y que utilizan Fe. El sistema “elemento regulador de hierro/ proteína de respuesta a hierro” (IRE/IRP) juega un papel central en dicha homeostasis (Muckenthaler et al., 2008). Este sistema funciona en base a la regulación traduccional dependiente de la unión Fe-dependiente de IRP1 o IRP2 a las secuencias IRE presentes en ARNm de proteínas tales como DMT1, FPN, receptor de Tf y Ft, para regular su expresión (**Figura 1**) (Wallander et al., 2006). Dependiendo si la secuencia IRE se encuentra en la región no traducida 3' (3'UTR) o 5' (5'UTR) el efecto de los IRP será positivo o negativo sobre la traducción de los ARNm. Así, si IRE está 3'UTR, el efecto observado es de estabilización del ARNm (ARNm de receptor de Tf e isoformas de DMT1), mientras que si se encuentra en la región 5'UTR (Ft, FPN) se inhibe la unión del ARNm al ribosoma. IRP1 e IRP2 responden de diferente manera a fluctuaciones del LIP. Si el LIP sube, IRP1 cambia su conformación inhibiéndose su unión a IRE (Guo et al., 1994), mientras que IRP2 responde aumentando su degradación vía proteosomal dejando de ejercer su acción constitutiva en los sitios IRE (Wallander et al., 2006).

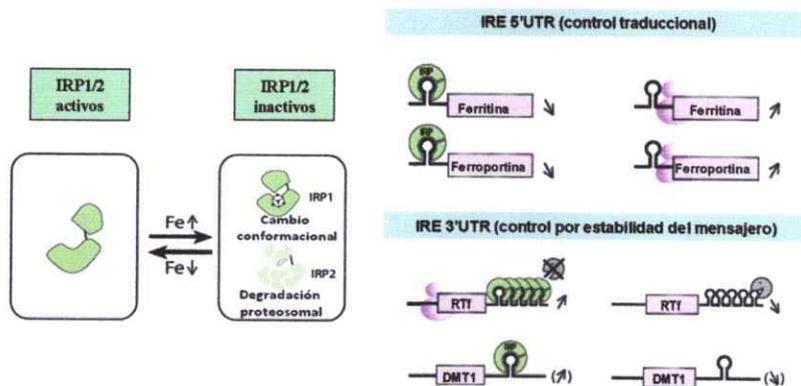


Figura 1: Sistema IRE/IRP. Un incremento de Fe intracelular inactiva ambos IRP; IRP1 por un cambio conformacional e IRP2 por degradación proteosomal. A una disminución del hierro ambos IRP reestablecen su actividad. (imagen izquierda). Mientras hay actividad IRP Ft y FPN ven disminuida su expresión por tener un sitio IRE en el extremo 5'UTR, aumentándose la misma cuando no hay actividad IRP, esto por el desbloqueo del ARN para que se una el ribosoma. En el caso de RTf y DMT1 al tener sitios IRE en el extremo 3'UTR, la actividad IRP provoca un aumento de la expresión ya que el ARN se ve más estabilizado, esto no ha sido demostrado para DMT1. Lo contrario pasa cuando no hay actividad IRE (imagen derecha). (Modificado de Hentze M, 2008).

La regulación de DMT1 por IRPs no es tan clara, esto debido a que en ratones mutantes sin IRP sigue existiendo una respuesta a los cambios del LIP por parte de DMT1 + IRE (Zoller et al., 2002) (Galy et al., 2008), es más, en cultivos no se ha obtenido evidencia determinante de que exista una regulación traduccional de DMT1, solo transcripcional (Gunshin et al., 2001) (Tchernitchko et al., 2002). También hay casos en que el mecanismo IRE/IRP parece no funcionar para FPN ya que se ha descrito que un aumento en el hierro apical disminuye los niveles de ARNm de FPN (Martini et al., 2002) niveles que deberían aumentar según el mecanismo IRE/IRP (**Figura 1**). Recientemente se reportó un nuevo transcrito de FPN (FPN1B) que no tiene un elemento IRE en su extremo 5'UTR. Este transcrito se expresa mayormente en células eritroides y duodenales (Zhang et al., 2009). La ausencia del elemento IRE en la región 5'UTR tiene como consecuencia que la expresión de FPN1B no aumente ante altos niveles de hierro, lo que prevendría un exceso de absorción de hierro.

Ferrocínética corporal

El hierro en el organismo forma parte de dos compartimientos: uno funcional, que incluye los diversos compuestos celulares que contienen o requieren hierro, y otro de depósito, el cual constituye la reserva corporal del metal. Esta manera de reservar el

hierro es la forma como el organismo controla su carencia o exceso, ya que como antes mencionado no existen mecanismos de excreción. Sin embargo existen formas no controladas y poco significativas de pérdida del metal a través de las lágrimas, sudor, descamación y orina (Barrios et al., 2000) El compartimiento de depósito lo conforman las moléculas de Ferritina (Hofto et al., 2008) y hemosiderina, localizados principalmente en el hígado. El intermediario entre estos compartimientos es la transferrina (Tf), proteína plasmática a la que se asocia el hierro férrico en el plasma y la sangre (Pérez et al., 2005) (**Figura 2**). A la Tf se le llama apo-Tf, Tf-monoférrica (Tf-Fe⁺³) y Tf-diférrica (Tf-2Fe⁺³) dependiendo de los átomos de hierro coordinados (Leibman and Aisen, 1979).

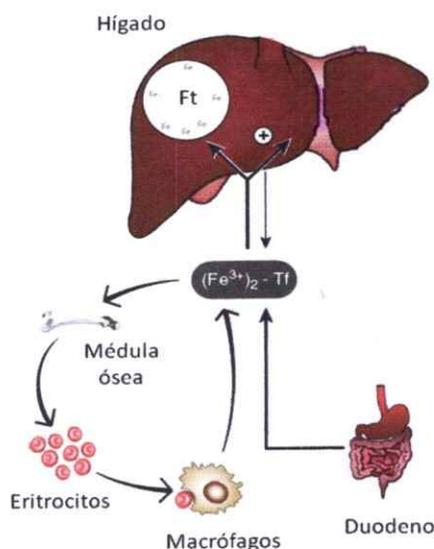


Figura 2: Metabolismo de Tf-2Fe⁺³. El hierro es absorbido por los enterocitos del duodeno para pasar al plasma unido a Tf, formando Tf-2Fe⁺³ molécula que transporta el hierro a través de la circulación. La mayor parte del hierro se dirige a la médula ósea para la síntesis de eritrocitos. El hierro presente en eritrocitos senescentes es reciclado por los macrófagos para reestablecer los niveles de hierro circulante. El exceso de hierro es acumulado mayormente en Ft de hígado. (Figura modificada de Hentze M, 2008).

Absorción intestinal de hierro

El único punto de control en la incorporación de hierro ocurre en los enterocitos, los cuales absorben el hierro dietario por dos mecanismos de acuerdo a los diferentes estados a que presenta en los alimentos: sal inorgánica de hierro e hierro hémico. Si bien el mecanismo de ingreso de hierro hémico es poco conocido, se sabe que el grupo hemo presente en proteínas tales como la hemoglobina y mioglobina es liberado de estas proteínas por acción de enzimas pancreáticas para luego ser incorporado a los enterocitos como una metaloporfirina intacta. Una vez dentro de la célula el grupo hemo es degradado por la hemo-oxigenasa, liberándose así el hierro inorgánico (Uzel and Conrad, 1998).

Por otra parte, la entrada del hierro inorgánico ocurre a través del transportador de metales divalentes DMT1, por lo que Fe^{+3} requiere ser previamente reducido a Fe^{+2} , función llevada a cabo por la proteína de membrana citocromo b duodenal (Dcytb) (Latunde-Dada et al., 2002) (**Figura 3**).

Como ya se ha mencionado, el hierro en el interior de los enterocitos pasa a formar parte del LIP, hierro que tiene varios destinos: ser incorporado en grupos hemo o FeS , acumularse en Ft o ser transportado a través de la membrana basolateral al plasma por FPN, para ser coordinado por la Tf plasmática previa oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} , realizado por la proteína de membrana hefaestina. (Kaplan, 2002). (**Figura 3**).

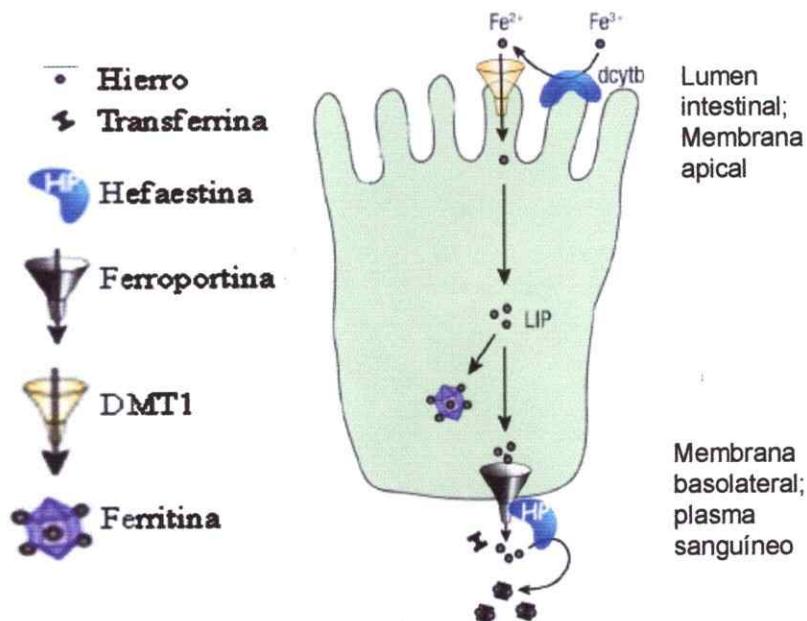


Figura 3: Transporte de Fe inorgánico en enterocitos. El Fe^{+2} ingresa a los enterocitos a través de DMT1. El Fe^{+3} en el lumen intestinal es reducido a Fe^{+2} por Dcytb para que ingrese a los enterocitos a través de DMT1. Una vez dentro de la célula el hierro pasa a formar parte del LIP desde donde puede ser captado por Ft o salir al plasma vía FPN previa oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} a cargo de la proteína de membrana Hefaestina. Este Fe^{+3} se une a apo-Tf formando Tf- $2Fe^{+3}$ manera en que el hierro es transportado por el organismo (modificado de Hentze M, 2008).

Homeostasis corporal del hierro - El rol de Hpc

Los niveles de hierro circulante son regulados por el pequeño péptido Hpc, el cual es liberado por el hígado a la circulación sanguínea cuando suben los niveles de hierro circulante (Frazer et al., 2002) (Muckenthaler et al., 2003). Al parecer la saturación de Tf es el principal indicador corporal para la liberación de Hpc (Lin et al., 2007). La saturación de Tf depende de la cantidad de hierro absorbido por los enterocitos, del hierro liberado por macrófagos en el reciclaje del hierro de los eritrocitos senescentes y del hierro utilizado en la eritropoyesis (Hentze et al., 2004).

Hepc es sintetizada como un precursor (pre-proHepc) de 84 aa el cual es clivado a proHepc (60 aa) que a su vez es procesada para dar origen a Hepc madura de (25 aa) (Park et al., 2001) y (Kemna et al., 2005). Estudios estructurales han demostrado que Hepc humana posee 8 residuos de cisteína formando 4 puentes disulfuro, los que configuran una sábana- β distorsionada en forma de horquilla (Figura 4).

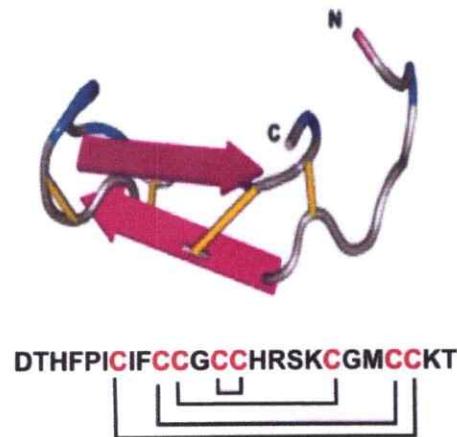


Figura 4. Secuencia aminoacídica y modelo de estructura de Hepc. En rojo de destacan las cisteínas y se ve en barras amarillas como establecen enlaces disulfuro entre ellas. Las flechas representan la sábana- β que le da la conformación en orquilla a este péptido (Figura de Ganz, 2003).

Hepc se expresa principalmente en hígado y en niveles bajos en músculo, intestino, estómago, colon, pulmón y corazón (Pigeon et al., 2001). En un principio Hepc se atribuyó un rol antimicrobiano por poseer una estructura similar a otros péptidos de esa naturaleza (Park et al., 2001) y porque su síntesis se ve inducida por estímulos inflamatorios (Nemeth et al., 2003). De hecho, Hepc tiene actividad antibacterial y antifúngica pero a concentraciones mayores de las que presenta en orina o sangre (Krause et al., 2000). Posteriormente, estudios con ratones transgénicos permitieron demostrar que la función de Hepc se relaciona con la homeostasis del hierro, donde

inhibiría la absorción de hierro intestinal (Nicolas et al., 2001), bloquearía el transporte de hierro a través de la placenta (Nicolas et al., 2002) y bajaría los niveles de hierro liberados por los macrófagos (Lesbordes-Brion et al., 2006). Por lo anterior, cuando los requerimientos corporales de hierro son altos, se inhibiría la expresión de Hcp, mientras que su expresión aumenta en casos de sobre carga de hierro (Frazer et al., 2002) (Figura 5).

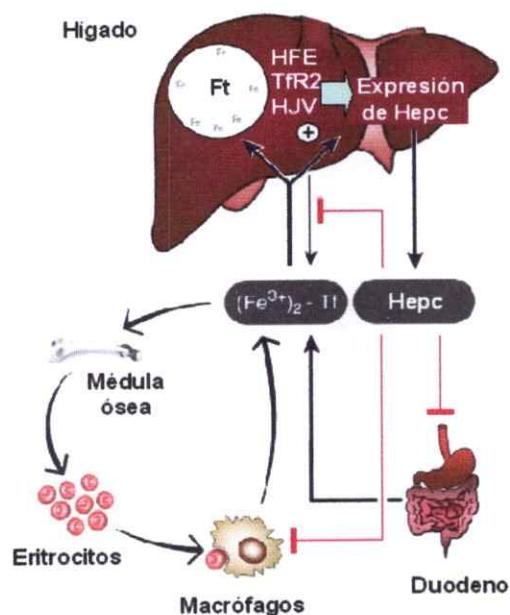


Figura 5: Mecanismo propuesto de modulación del metabolismo del Fe por acción de Hcp. Metabolismo del Fe (flechas negras). Efecto de Hcp (flechas rojas). El hierro es absorbido por los enterocitos del duodeno para pasar al plasma unido a Tf, formando $Tf-2Fe^{+3}$ molécula que transporta el hierro a través de la circulación. La mayor parte del hierro se dirige a la médula ósea para la síntesis de eritrocitos. El hierro presente en eritrocitos senescentes es reciclado por los macrófagos para reestablecer los niveles de hierro circulante. El exceso de hierro es acumulado mayormente en Ft de hígado. El efecto de Hcp en la homeostasis del hierro es la de bloquear la liberación de este elemento al plasma desde sus tres principales fuentes; de absorción por el duodeno, de reciclaje por macrófagos y de reservas del hígado. El incremento en los niveles de $Tf-2Fe^{+3}$ estimula la liberación de Hcp a la circulación mediante la acción de tres proteínas reguladoras descritas recientemente; HFE, Tfr2 y HJV (Figura modificada de Hentze M. 2008).

Se ha propuesto que la expresión de Hcp es regulada por al menos 3 proteínas secretadas por el hígado: la proteína de la hemacromatosis (HFE) (Feder et al., 1996), la haemojuvelina (HJV) (Papanikolaou et al., 2004) y el receptor de transferrina 2 (TfR2) (Camaschella et al., 2000) (**Figura 5**). La importancia de estas proteínas es patente ante la hemacromatosis, que se observa en pacientes que poseen mutaciones en estos genes (Cazzola, 2003).

Existe evidencia que Hcp cumple su función porque interacciona con FPN lo que induce su internalización y posterior degradación en lisosomas. Esta observación, realizada en las líneas celulares HEK293, Hela (Nemeth et al., 2004) y J774 (Delaby et al., 2005), llevó a postular que Hcp ejercería su acción en enterocitos por medio del mismo mecanismo, sin contar con prueba directa.

Estudios recientes muestran que el efecto de Hcp en enterocitos ocurre sobre DMT1 y no sobre FPN (Chaston et al., 2008 y Mena et al., 2008) . Esta interpretación surge porque al tratar enterocitos con Hcp bajan los niveles tanto de DMT1 como de su mensajero, mientras que los niveles de FPN se mantienen constantes. Estos cambios explican la disminución en la absorción de Fe. Esta particular reacción del enterocito ante Hcp apunta a que su efecto es célula-específico, lo que no sería el único comportamiento célula específico en lo que a la homeostasis de hierro se refiere. A modo de ejemplo, FPN en macrófagos alveolares y en enterocitos reacciona de manera opuesta a las fluctuaciones de los niveles de hierro, mientras que FPN aumenta en enterocitos por deficiencia de hierro, en macrófagos alveolares aumenta por suplementación de este elemento (McKie et al., 2000) (Yang et al., 2002).

Considerando que Heps es una señal de exceso de hierro en el organismo, evaluamos el efecto de Heps purificada a partir de medios condicionados de células Hep-G2, sobre la incorporación de hierro y la ubicación de los transportadores de hierro DMT1 y FPN en células Caco-2, un modelo *in vitro* de epitelio intestinal.

4.2 Hipótesis de trabajo

En células Caco-2, Heps produce una señal similar a un aumento de la oferta de hierro, induciendo redistribución apical-basolateral de los transportadores de entrada (DMT1) y de salida (FPN), modificando la incorporación de hierro.

4.3 Objetivo General.

Establecer el efecto de tratamientos con Heps sobre la distribución de los transportadores DMT1 y FPN en las membranas apical y basolateral de células Caco-2.

4.4 Objetivos Específicos

1. Obtención y purificación parcial de Heps a partir de medios condicionados de células Hep-G2.

1.1. Producción de Heps nativa.

1.2. Purificación parcial de Heps.

1.3. Determinación de las características de migración electroforética de Heps sintética.

1.3.1. Caracterización de agentes reductores.

1.3.2. Caracterización de la concentración de SDS.

1.3.3. Caracterización del pH del tampón de corrida

2. Caracterización de Hefc en la incorporación apical de hierro.

3. Determinar el efecto de hierro en la distribución de los transportadores DMT1 y FPN en las membranas apical y basolateral de células Caco-2.

4. Determinar el efecto de Hefc en la distribución de los transportadores DMT1 y FPN en las membranas apical y basolateral de células Caco-2.

5. Materiales y Métodos

5.1 Materiales.

5.1.1. Materiales y reactivos generales.

De las siguientes empresas, se obtuvieron los reactivos y materiales listados a continuación.

Pierce Chemical Company: Solución de Iodogen (28600), Tubos Iodogen; Sulfo-SS-biotina (21331); Super Signal West PICO Chemiluminescent substrate (34080). NHS-imino biotin (21217).

PerkinElmer: $^{55}\text{FeCl}_3$, 5mCi (070812B).

Comisión Chilena de Energía Nuclear: Na^{131}I , 5 mCi (I-131000).

Merck: N-N'-Methylenediacrylamine (110897); NaOH (106498); $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (160482); MgCl_2 (105833); KCl (104636); KH_2PO_4 (104873); NaCl (106404); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (106580); HCl (100317); EDTA (1118011); Glicerol; Etanol absoluto (1.00983); NaHCO_3 (6329); CH_3COONa (6267); NaH_2PO_4 (6346); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; Na_2CO_3 (6392); $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (6664); CuSO_4 (2790); SO_4NH_4 (1217); BSA (1.12818.0100); Cloroformo (02445); Metanol (60009); Isopropanol (009634).

Winkler: acrilamida (BM-0070); Tris (BM-2000); glicina (BM-0820); Hepes (BM-0855).

Sigma Chemical Company: Tween 20 (P-5627); Triton X-100 (T-6878); Inhibidor de proteasas, (AEBSF-[4-(2-aminoethyl)benzenesulonyl fluoride hydrochloride], Aprotin, Bestatin hydrochloride, E-64, Leupeptin hemisulfate salt y Pepstatin A (P-8340); SDS (L-3771); 2-Mercapetanol (M-3148); DTT (D-9779); Glutación reducido (G-6529); Tricina (T-0377); Temed (T-8133); APS (A-9164); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (S-9125); NaN_3 (S-2002); Dipiridilo (D-7505); NTA (N-7642); Pepstatina (P-4665).

BIO-RAD: Coomassie Brilliant Blue R-250 (161-0400); Azul de Bromofenol (161-0404); CHELEX (142-2822); Precision plus protein standars dual color (161-0374); Resina de intercambio aniónico (AG1 X8).

Gibco-Invitrogen: Optimem (31985); Aminoácidos no esenciales (11140); Antibióticos (15240); Piruvato de Sodio; FBS; DMEM (12100-046).

Biosynthesis Incorporated: Heps-25 (M-1731); anticuerpo policlonal de conejo contra todas las isoformas de DMT1 (PanDMT1).

Millipore: Filtros de 10 KDa Centricon plus 20.

5.1.2. Anticuerpos e inmunodetección.

- Anticuerpos anti-FPN:

1) Contra la secuencia carboxilo-terminal CGPDEKEVTKENQPNTSVV preparado en conejo (BioSonda, Chile).

2) Contra la secuencia carboxilo-terminal CGPDEKEVTKENQPNTSVV preparado en ratón (Lab. de Inmunología Dr. Maria Rosa Bono).

- Anticuerpos anti-DMT1:

1) anti-DMT1 de conejo, contra el tercer loop extracelular QVLRGMFVPCS (PanDMT1; Biosynthesis Inc).

2) anti-DMT1+IRE de conejo, contra la secuencia amino-terminal MVLGPEQKMSDDSVSGDH común a todas las isoformas de la proteína (PanDMT1; Biosynthesis Inc.).

- Anti-IgG de conejo preparado en cabra conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce 31460).

- Anti-IgG de ratón preparado en conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce 31450).

5.1.3. Materiales de Cultivo.

Botellas plásticas de 40 mL, área de crecimiento 25 cm², Costar (3025).

Placas de cultivo 100mm x 20mm, 60mm x 15mm y de 35mm x 10mm, Cosrning (430167).

Tubos de centrifugas plásticos 50 mL y 15 mL, Falcon.

Unidades de filtración desechables, tamaño poro 0,2 µm Milipore, 500 mL.

Flitros 0,22 µm Millex GP.

Placas de ELISA, Nunc Inc.

Insertos bicamerales Transwells-Clear, con membrana de poliéster, tamaño poro de 0,4 μm , 6,5 mm de diámetro, Costar (3470).

Botellas de vidrio reutilizables, Shott Duran, 500-mL.

5.1.4. Células.

Células Caco-2: Línea celular de la American Type Culture Collection (ATCC, #HTB37, Rockville, MD), derivada originalmente de un cáncer de colon, semeja un modelo de epitelio intestinal. Estas células expresan GLUT-5, un marcador de microvellosidades de intestino delgado que no se encuentra en colon. Crecen en monocapas altamente polarizadas y pueden ser usadas para transporte vectorial, presentan inhibición de la proliferación por contacto, forman uniones estrechas con una resistencia transepitelial de 280-320 $\text{ohm} \times \text{cm}^2$ y presentan abundantes microvellosidades. Estas células pueden cultivarse tanto en plástico, vidrio como en insertos bicamerales.

Células Hep-G2: Línea celular de ATCC (#HB-8065) derivada de un carcinoma hepático de un varón caucásico de 15 años. Estas células tienen una morfología epitelial. Se usan comúnmente para estudiar la síntesis de proteínas mediadas por citoquinas, pero serán ocupadas para la obtención de Hepc.

5.1.5. Equipos.

Microscopio Óptico Nikon TMS;

Campana de Flujo laminar, Nuaire, UN-201-430;

EVOM Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments);

Lector de placas ELISA SUNRISE (TECAN);

Cámaras electroforéticas BIO-RAD;

Fuente de poder PS 4010-2 (Sigma-Aldrich);

Centrifuga Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Germany);

Centrifuga SORVALL RT 6000B;

Agitador GX-1000 (Labnet);

pH-metro Suntex SP-701;

Fisher Vortex Genie 2;

Espectrofotómetro Lambda;

Baño termorregulado Memmert;

Incubador Orbital SI50;

Incubador de CO₂;

Contador de radioactividad beta Cobra II autogamma;

5.2 Métodos.

5.2.1 Cultivo Celular.

Las líneas celulares Caco-2 y HepG2 fueron sembradas calculando una densidad inicial aproximada de 20.000 células/cm², en diferentes tamaños de botellas y pocillos considerando los requerimientos experimentales. Las células Caco-2 fueron cultivada en DMEM y las células Hep-G2 en MEM, ambos medios suplementados con FBS 10%, 100.000 UI de antibióticos (penicilina/estroptomina), aminoácidos no esenciales, NaCO₃ 18mM y piruvato de sodio 1mM. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días previo lavado con PBS por 3 veces. Para resembrar, los cultivos en confluencia fueron disociados con tripsina al 0,25% y EDTA 5 mM. La confluencia de las células de determinó por microscopía óptica y para los insertos bicamerales midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). La incubación fue a 37°C y la concentración de CO₂ fue 5%.

5.2.2. Marcaje de Hepc con ¹³¹I.

Hepc fue marcada con ¹³¹I (5 mCi/mg proteína) usando el reactivo Iodogen (Pierce Chem. Co.), siguiendo el protocolo recomendado por la empresa. Luego de la iodización, Hepc-¹³¹I fue separada del ¹³¹I libre por incubación con resina de intercambio aniónico por 24 hr a 4°C con tres cambios de la resina.

5.2.3 Obtención de una preparación de Hepc parcialmente purificada.

Considerando altas concentraciones de hierro en el plasma sanguíneo inducen la síntesis de Hpc en el hígado, se obtuvo un medio rico en Hpc a partir de cultivos confluentes de células Hep-G2 que se mantuvieron en medio OPTIMEM adicionado con FeNTA 40 μ M por 48 hr. El FeNTA se obtuvo a partir de la mezcla de FeCl₃ y NTA en una proporción 1:2,2, mol:mol. El medio condicionado fue recolectado y tratado con 30% de CHELEX por 24 hr con agitación para eliminar el hierro del medio de cultivo. Por último el medio se pasó por un filtro de 10 KDa contrifugando por 30 min a 2.000 rpm. El filtrado corresponde a la Hpc parcialmente purificada. Además de esta Hpc, denominada Hpc PP1, se ocuparon otras 2 pertenecientes al stock del laboratorio a las que llamamos Hpc PP2 y 3. Estas Heps fueron obtenidas a partir de células HEK293 transfectadas establemente con un plasmidio que contiene el cDNA codificante de la Hpc. Estas células al llegar a un 80% de confluencia fueron crecidas en medio DMEM sin suero durante 24 hr, tras lo cual el medio fue recolectado y filtrado de igual manera que Hpc PP1.

5.2.4 Cuantificación del Fe en los medios de cultivo.

Para determinar la concentración de Fe en los medios de cultivos se utilizó el método colorimétrico con α , α' -dipiridilo. Para esto se generó una solución 8:1:1 de Medio de cultivo, Na₂S₂O₅ 0,375M y α , α' -dipiridilo 0,5% en ácido acético al 60%. Esta solución fue incubada por 1 hr a 100 °C para luego medir su absorbancia a 520 nm, la absorbancia se pasó a concentración ocupando una curva de calibración previamente confeccionada.

5.2.5. Determinación de las características de migración electroforética de Hepc-25 marcada con ^{131}I .

La migración de Hepc- ^{131}I sintética de 25 aa (Biosynthesis Incorporated) fue cuantificada en geles de SDS-poliacrilamida al 20%. Después de la electroforesis, el carril cargado con Hepc- ^{131}I fue cortado en pedazos de 2mm a las que se les determinó la radioactividad del ^{131}I .

Con el fin de obtener una migración de Hepc con mejor resolución debido a que en experimentos iniciales se observó una migración difusa, se realizaron electroforesis bajo distintas condiciones de amortiguador de muestra y amortiguador de corrida, ocupando: amortiguador de muestra (Tris-HCl pH 6,8, Glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 14,4 mM y azul de Bromofenol 0,1%) y amortiguador de corrida estándar (Tris 25mM, Glicina 192mM y SDS 0,1%); amortiguador de muestra sin β -mercaptoetanol y amortiguador de corrida estándar; amortiguador de muestra con 50mM y 85 mM DTT en lugar de β -mercaptoetanol y amortiguador de corrida estándar; amortiguador de muestra con SDS 6% y amortiguador de corrida estándar; amortiguador de muestra estándar y amortiguador de corrida con tampón Tris- Tricina pH 8,5 (Schägger and von Jagow, 1987). Las proteínas antes de ser cargadas en los geles de poliacrilamida fueron incubadas a 95°C por 5 min.

5.2.6. Biotinilación selectiva de las membranas apical o basolateral de células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales.

Las células Caco-2 fueron crecidas en insertos bicamerales de 6,5 mm de diámetro. Los insertos bicamerales permiten exponer las superficies apical y basolateral de las células polarizadas. La confluencia se determinó midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), la cual en confluencia supera los $240 \Omega \times \text{cm}^2$, resistencia alcanzada tras 16 días de incubación.

La solución de biotina fue preparada agregando 0,5 mg/ml de NHS-imino biotina a una solución de PBS pH 8,0, CaCl_2 0,5mM y MgCl_2 1mM a 4°C. Las células a biotinar se lavaron 3 veces con PBS pH 8,0, CaCl_2 0,5mM, y MgCl_2 1mM a 4°C. Se agregó la solución de biotina al medio apical o basolateral de los insertos bicamerales dependiendo del experimento, mientras que el medio contrapuesto se dejó en PBS pH 8,0, CaCl_2 0,5mM y MgCl_2 1mM. Se incubó por 30 min a 4 °C. Se cambió la solución de biotina por una recién preparada y se incubó nuevamente por 30 min a 4 °C. Se lavó con PBS pH 8,0, CaCl_2 0,5mM, MgCl_2 1mM, NH_4Cl 50mM y PBS pH 8, CaCl_2 0,5mM y MgCl_2 1mM. Las células fueron cosechadas con Tris-EDTA y recuperadas a un tubo falcon de 15 ml. Se centrifugó a 2.000 rpm por 3 min. Las células se resuspendieron en 200µL de amortiguador de lisis (NP40 0,5%, Hepes 10mM pH 7,5, MgCl_2 3mM, KCl 40mM, PMSF 1mM, Leupeptina 10µg/ml, Aprotinina 0,5µg/ml, Pepstatina 0,6 µg/ml, Glicerol 5%, DTT 1mM) y se incubó por 1 hr a 4°C. Se centrifugó a 12.000 rpm por 15 min y se recolectó el sobrenadante (extracto total). Se determinó la concentración de proteínas del extracto total por el método del ácido bicinonínico (BCA).

Las proteínas biotinizadas se aislaron del resto utilizando estreptoavidina. 30 µg de proteínas del extracto total recibieron 10µL de estreptoavidina inmovilizada en perlas de sefarosa al 50%. Se incubó por 3 hr a 4°C y se centrifugó a 1.300 rpm por 1 min a

4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó por centrifugación con tampón TPII (Tris-HCl 20mM pH 8,0, NaCl 150mM, EDTA 5mM, BSA 0,2%, SDS 0,1%), después con tampón TPIII (Tris-HCl 20mM pH 8,0, NaCl 150mM, EDTA 5mM, BSA 0,2%) y finalmente con tampón TPIV (Tris-HCl 20mM pH 8,0). Las perlas de sefarosa en el sedimentado de la centrifugación contenían las proteínas biotiniladas.

5.2.7. Inmuno blot para DMT1 y FPN.

Para llevar a cabo los Inmuno blots (Western blots) se siguió el protocolo descrito en "Protein Methods" (Bollag et al., 1996). El método de detección fue a través de la reacción catalizada por peroxidasa de rábano, la cual fue llevada a cabo como está descrito en las instrucciones del kit "Super Signal West PICO Chemiluminescent substrate". La dilución de los anticuerpos fue: anti-FPN 1:2000, anti-DMT1 1:500, anti-IgG de conejo 1:1000 y anti-IgG de ratón 1:10.000, esto para ambos tipos de anticuerpos anti-DMT1 y anti-FP. La exposición a la película fotográfica fue entre 30 segundos y 30 min, según la intensidad de la señal de luminiscencia.

5.2.8. Efecto de la concentración de hierro en el medio en la distribución de DMT1 y FPN.

Caco-2 en confluencia crecidas en insertos bicamerales se incubaron por 4 hr con 2, 10 o 30 μ M de hierro ofrecido como Fe-NTA (1:2,2 mol:mol) al medio de cultivo, tanto en el medio apical como basolateral. Las concentraciones de hierro elegidas corresponden a concentraciones baja (2 μ M) mediana (10 μ M) o alta (30 μ M).

Posteriormente se biotiniló las membranas basolaterales y apicales por separado para luego hacer Western-blot anti DMT1 y FPN.

5.2.9. Efecto de Hepc en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2.

Células Caco-2 fueron crecidas por 16 días en insertos bicamerales. Los insertos bicamerales permiten exponer las superficies apical y basolateral de las células Caco-2 polarizadas. Luego las células se incubaron en el medio basolateral, es decir en contacto con la superficie basolateral, por 12 hr con las distintas Hpc parcialmente purificadas, las cuales fueron diluidas a un 50% con DMEM sin suero y llevadas a una concentración de FeNTA $1\mu\text{M}$. El control negativo fueron células Caco-2 confluentes incubadas 12 hr con medio DMEM sin suero FeNTA $1\mu\text{M}$. Se biotiniló las membranas basolaterales y apicales por separado para luego hacer Western-blot anti DMT1 y anti FPN.

5.2.10. Efecto de Hpc en la incorporación de Fe por Caco-2.

Células Caco-2 fueron crecidas en insertos bicamerales de 6,5 mm de diámetro por 16 días. Una vez alcanzada la TEER esperada, se agregó $1\mu\text{M}$ de ^{55}Fe -NTA en el medio apical, mientras que el espacio basolateral se incubó uno de los siguientes medios de cultivo: DMEM más FeNTA $1\mu\text{M}$ y DMEM con las distintas muestras de Hpc parcialmente purificada en dilución 1:1 y llevadas a una concentración de FeNTA $1\mu\text{M}$. Se incubó por 12 hrs. Se lavó dos veces con PBS más EDTA 1mM a 4°C y 2 veces con PBS a 4°C . La incorporación de ^{55}Fe se cuantificó contando la radiación que emiten las células en el contador de radioactividad beta Cobra II Auto Gamma.

5.2.11. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Tukey con el programa InStat (GraphPad Software). Los valores se expresaron como el promedio de las mediciones \pm error estandar (SEM). Las determinaciones se repitieron 3 veces. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (***).

6. RESULTADOS

6.1. Obtención y purificación parcial de Hepc a partir de medios condicionados de células Hep-G2.

6.1.1 Obtención y purificación parcial de Hepc nativa

Hepc es producida por el hígado en respuesta a alto hierro circulante. Anteriormente se había demostrado en nuestro laboratorio que la línea de hematoma humano HepG2 produce Hepc (Mena et al., 2006). Desarrollamos la metodología para obtener Hepc nativa cultivando las células en medio libre de suero (OPTIMEM) al que le adicionamos 40 μM de Fe-NTA. La Hepc presente en el medio de cultivo después de dos días de cultivo se sometió a una purificación parcial. Inicialmente se eliminó el exceso de hierro del medio incubándolo con el quelante de metales Chelex, que tiene gran afinidad por hierro. Después de 24 hr de incubación, la concentración de hierro bajó a niveles indetectables por el método del dipiridilo (datos no mostrados), por lo que la concentración de Fe debió ser menor a 2 μM , el límite de resolución de este método. Aunque el medio OPTIMEM® no contiene suero y su fórmula es secreta (invitrogen), se sabe que contiene sustancias de alto peso molecular como transferrina e insulina. Estos elementos fueron eliminados por filtración en membranas que retienen componentes mayores a 10.000 Dalton. Al filtrado de esta centrifugación se le denominó Hepc PP1. En este Seminario se usaron otras dos preparaciones de medios condicionados ricos en Hepc, Hepc PP2 y Hepc PP3, elaboradas en el laboratorio acorde a lo explicado anteriormente.

6.1.2. Determinación de las características de migración electroforética de Hepc-25 marcada con ^{131}I .

Hasta el momento, no existe en la literatura una metodología para determinar la presencia del péptido maduro de Hepc (Hepc de 25 aminoácidos) por Western blot. Es posible que esta deficiencia sea debida a una migración anómala de Hepc, causada por el alto número de puentes disulfuro o por su característica de péptido catiónico. Por lo tanto se determinaron las características de migración electroforética de Hepc.

Hepc sintética de 25 aminoácidos (Biosynthesis Incorporated) fue marcada radioactivamente con ^{131}I y sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20%. Se efectuaron variaciones en las condiciones de electroforesis, tanto en el amortiguador en que se solubiliza la muestra como en el amortiguador utilizado en la corrida de electroforesis.

Utilizando los amortiguadores basales, Hepc migró en forma difusa, encontrándose en 4 fracciones del gel, equivalente a 8 mm. Se concentró en un PM aparente de 6,9 KDa (**Figura 6, serie estándar**). El último pico de radioactividad en esta y las siguientes figuras corresponde a ^{131}I no unido al péptido, determinado en una electroforesis de Na^{131}I .

El amortiguador de muestra podría estar reduciendo solo parcialmente los puentes disulfuro de la Hepc, produciendo de esta forma una heterogeneidad en la muestra que podría resultar en una migración difusa. Se probó utilizar el reductor

ditiotreitól (DTT) en reemplazo del β -mercaptoetanol, bajo el razonamiento que podría ser un mejor reductor de los puentes disulfuro. DTT 50 mM (**Figura 6, serie DTT 50 mM**) y 85 mM (**Figura 6, serie DTT 85 mM**), generaron el mismo perfil de migración de Heps que β -mercaptoetanol.

En otra aproximación, se eliminó el β -mercaptoetanol en el amortiguador de muestra, una condición que debiera mantener intactos los enlaces disulfuro de la Heps y posiblemente generar una muestra más homogénea. Bajo esta condición, Heps migró de manera diferente comparado con las condiciones estándar, apareciendo 2 picos de Heps con PM aparentes de 22,5 Kda y 5,8 KDa (**Figura 6, serie sin reductor**). La presencia de dos picos podría deberse a enlaces disulfuro entre 2 o más moléculas de Heps.

Además de su propiedad de solubilizar membranas y disociar complejos proteicos, el SDS al unirse a las proteínas les confiere una carga neta negativa, lo que permite separarlas solo por el criterio de tamaño (Laemmli, 1970). Al aumentar al triple la concentración de SDS en el amortiguador de muestra (SDS al 6%) no se observaron cambios en el perfil de migración, apareciendo el pico de Heps en un PM aparente de 6,1 KDa (**Figura 6, serie SDS 6%**).

Amortiguadores de Tris-Tricina han sido indicados como mejores que los en base a Tris-Cl para la separación de péptidos pequeños (Schägger and von Jagow, 1987). Al usar Tris-Tricina 100 mM, SDS 0,1%, pH 8,5 como amortiguador de corrida, también se generó el mismo perfil de migración, con un pico de Heps de un PM aparente de 5 KDa (**Figura 6, serie Tris-Tricina**). Tampoco se observaron cambios en la migración de

Hepc al usar Tris-Tricina como amortiguador de corrida con DTT o Glutión (datos no mostrados) en lugar del β -mercaptoetanol en el amortiguador de muestra.

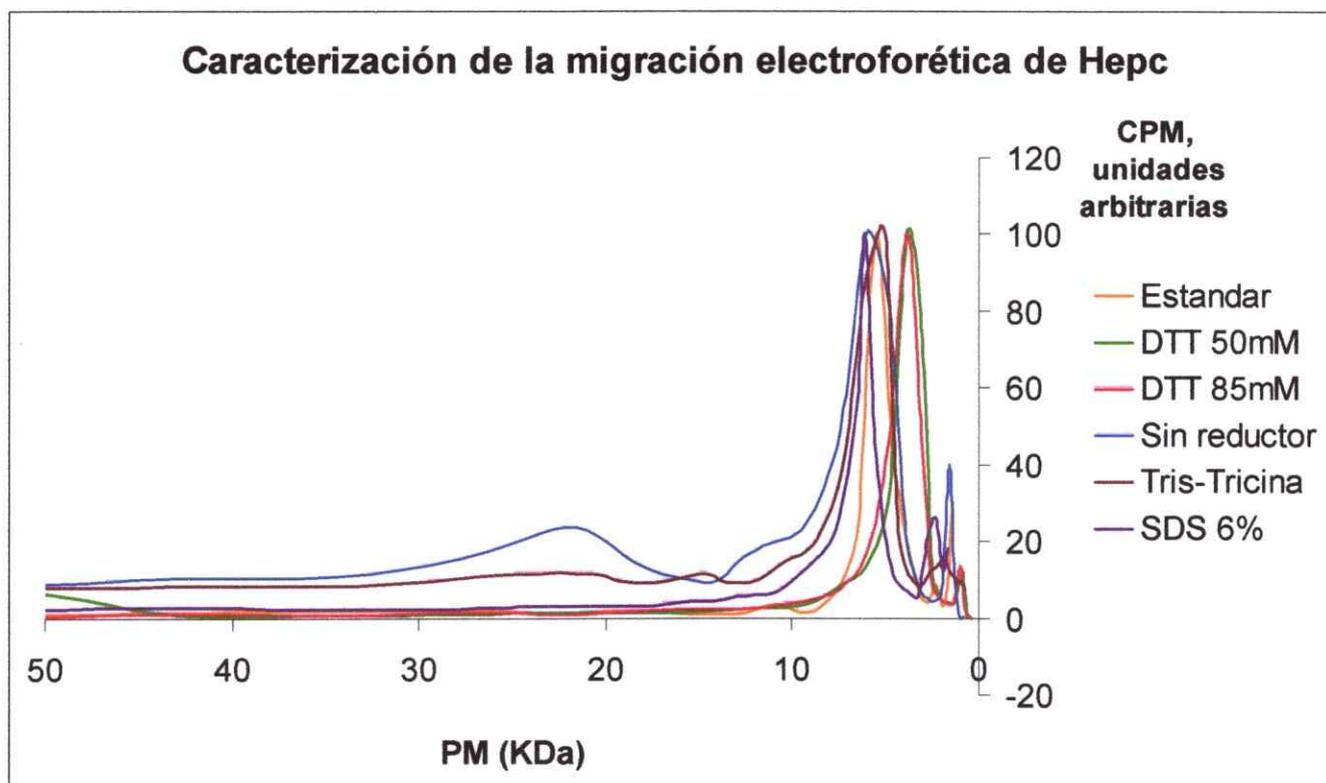


Figura 6: Caracterización de la migración electroforética de Hepc: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% con 2% SDS de Hepc-25 marcada con ^{131}I utilizando diferentes condiciones de corrida. Después de la corrida, el gel fue cortado a lo largo en segmentos de 2mm. Se graficó el PM que le corresponde a cada fracción del gel v/s la radioactividad de ^{131}I expresada en unidades arbitrarias de cpm, se graficó a partir de 50 KDa para efectos visuales.

6.2. Caracterización de Hepc PP en la incorporación apical de ^{55}Fe .

Para comprobar la presencia de Hepc en el medio condicionado, se efectuó un ensayo de actividad, consistente en registrar si la incorporación apical de hierro en células Caco-2 disminuye en presencia de Hepc, efecto de este péptido sobre las células

epiteliales (Mena et al., 2008). Para esto se determinó la incorporación de ^{55}Fe en Caco-2 incubadas con Heps PP1, 2 y 3 por separado. Se ocupó Heps PP1, PP2 o PP3 al 50 %, los cuales fueron diluidos en DMEM sin suero, estas soluciones fueron llevadas a una concentración final de $1\mu\text{M}$ FeNTA. Se observó una disminución de alrededor del 50% del hierro incorporado en las células Caco-2 tratadas con las distintas Heps PP (Figura 7).

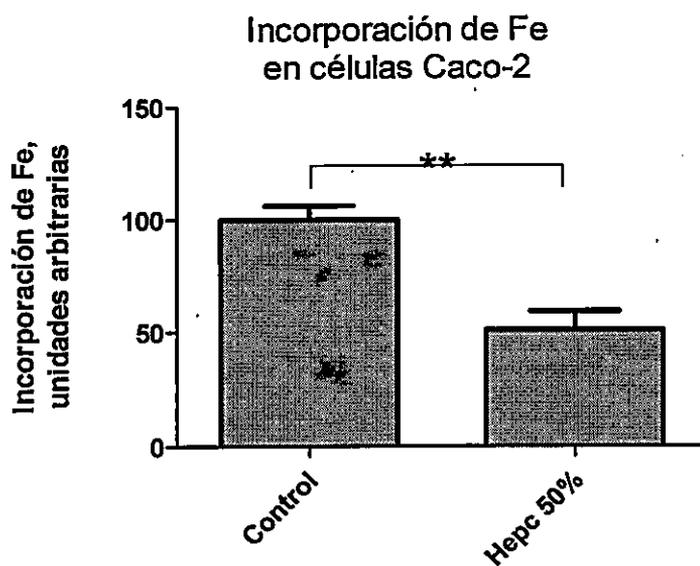


Figura 7: Incorporación de Fe^{55} en células Caco-2. Caco-2 crecidas hasta confluencia en insertos bicamerales se incubaron en el medio basolateral por 12 hrs con Heps PP1, 2 y 3 diluidas en un 50% con DMEM sin suero y $1\mu\text{M}$ ^{55}Fe -NTA en el medio apical. Se graficó el porcentaje de picomoles de ^{55}Fe absorbido por las células tratadas con las distintas Heps PP con respecto al control. Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$). Se observó una disminución significativa de aproximadamente un 50% en la incorporación de Fe^{55} con respecto al control. **, $P<0,01$.

6.3. Efecto del Fe en la redistribución de DMT1 y de FPN en Caco-2.

Experimentos preliminares de nuestro laboratorio indicaban que altas concentraciones de hierro inducen una disminución de la incorporación apical de hierro. Decidimos probar, usando la metodología de biotilación selectiva de las membranas

apical y basolateral, si la ubicación apical/basolateral de los transportadores DMT1 y FPN1 es función de la concentración de hierro a la que se exponen las células y si Heps induce un cambio en la posición apical/basolateral de los transportadores. En células Caco-2 incubadas por 4 hr con distintas concentraciones de Fe, se observó que el aumento de la concentración de hierro en el medio de 2 a 30 μM indujo una disminución significativa en la ubicación apical de DMT1 y un aumento significativo en su ubicación basolateral (Figura 8A y 8B).

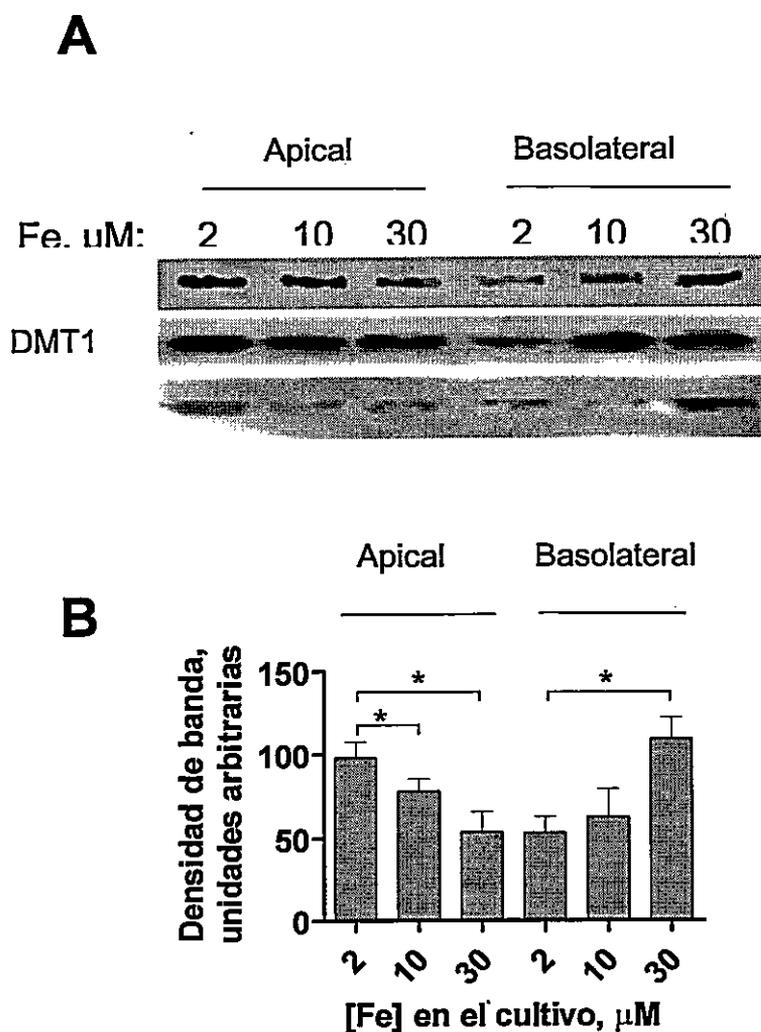


Figura 8: Efecto del Fe sobre DMT1. A: células Caco-2 se incubaron por 4 hr a 37°C en medios conteniendo las concentraciones de hierro indicadas en la Figura. Posteriormente las

*células se enfriaron a 4°C y se biotiniló su superficie apical o basolateral. Las proteínas que contenían biotina se seleccionaron por precipitación con estreptoavidina y se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. DMT1 se reconoció con un anticuerpo específico mediante metodología western. Se muestran 3 experimentos independientes. B: análisis densitométrico de las bandas mostradas en A. Los valores representan la media ± SEM. *, P < 0,05.*

En el caso de FPN (Figuras 9A y 9B), se observó que el aumento de la concentración de Fe en ambos dominios produjo un aumento de FPN en la membrana apical que no fue significativa. En la membrana basolateral, en donde FPN se expresa en mayor cantidad y realiza su labor fundamental de mediar la salida de hierro hacia la circulación sanguínea, se observó una disminución a medida que la concentración de Fe fue aumentando. Similarmente a los cambios en la membrana apical, esta disminución no fue significativa respecto a la situación de bajo hierro

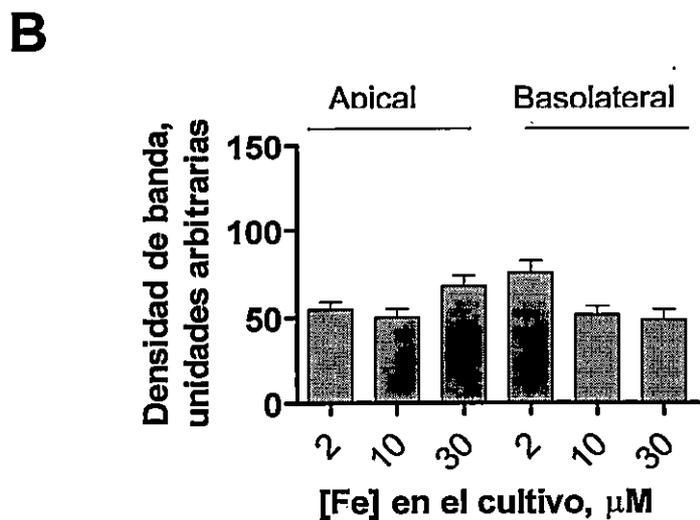
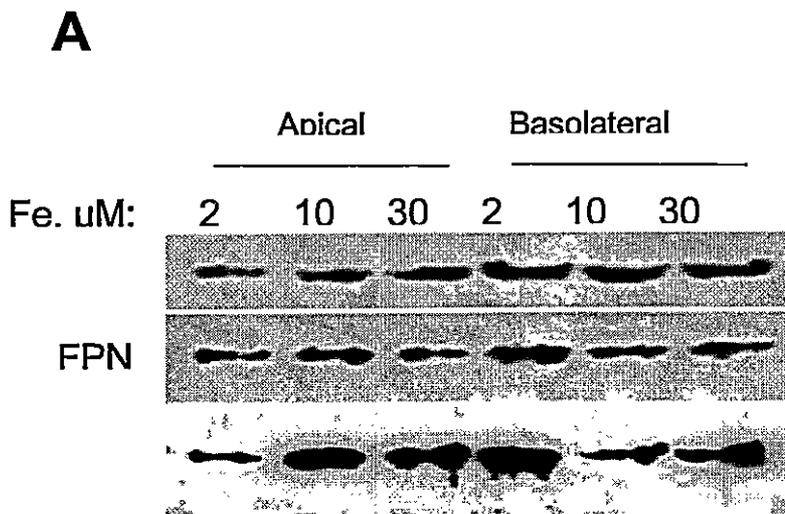


Figura 9: Efecto del Fe sobre FPN. A: células Caco-2 se incubaron por 4 hr a 37°C en medios conteniendo las concentraciones de hierro indicadas en la Figura. Posteriormente las células se enfriaron a 4°C y se biotiniló su superficie apical o basolateral. Las proteínas que contenían biotina se seleccionaron por precipitación con estreptoavidina y se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. FPN se reconoció con un anticuerpo específico mediante metodología western. Se muestran 3 experimentos independientes. B: análisis densitométrico de las bandas mostradas en A. Los valores representan la media \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de FPN entre las diversas condiciones.

6.4. Efecto de Hepc en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2.

El medio basolateral de células Caco-2, fue suplementado con diferentes soluciones de hepc. Tras 12 hr de incubación se biotiniló la membranas apical y basolateral y se determinó la presencia de FPN y DMT1 por western blot. En el caso de DMT1 apical hubo una disminución aproximada de un 30% con respecto al control, mientras que en DMT1 basolateral, FPN apical y FPN basolateral no hay cambios con respecto al control (Figura 10).

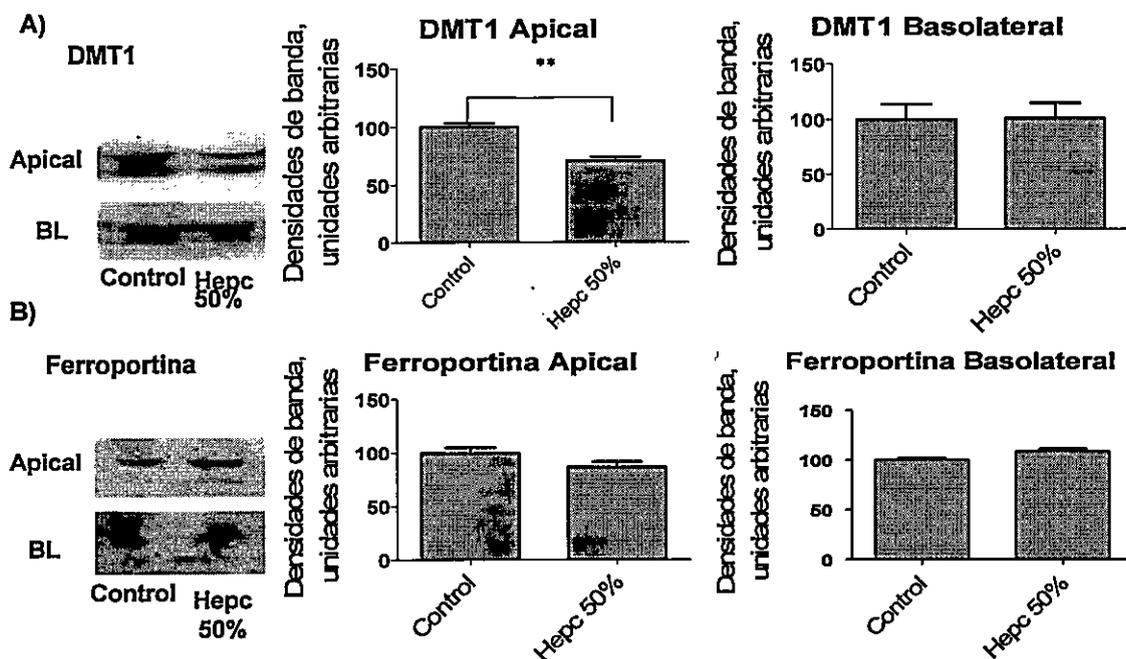


Figura 10: Efecto de Hepc sobre DMT1 y FPN. Células Caco-2 crecidas en insertos bicamerales en confluencia fueron incubadas con DMEM sin suero $1\mu\text{M}$ FeNTA (control) y con las distintas Hepc PP disueltas a un 50% en DMEM sin suero y llevadas a $1\mu\text{M}$ FeNTA. Posteriormente las células se enfriaron a 4°C y se biotinilaron ya sea por la membrana apical o la basolateral. Las proteínas que contenían biotina se seleccionaron por precipitación con estreptoavidina y se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. FPN y DMT1 se reconocieron con anticuerpos específicos mediante metodología western. En A) y B) se muestra un experimento representativo de western anti-DMT1 y anti-FPN respectivamente para biotinilación apical y basolateral. Los gráficos son análisis densitométricos de las bandas obtenidas ($n=3$). Los valores representan la media \pm SEM. Se encontraron diferencias significativas solo para DMT1 apical, disminuyendo versus el control en aproximadamente en un 30% . **, $P<0,01$.

7. DISCUSIÓN

7.1. Obtención y actividad de Hepc parcialmente purificada.

En concordancia con experimentos anteriores del laboratorio (Mena et al., 2008), se encontró que Hepc PP1 ejerce una actividad inhibitoria de la incorporación de hierro a los enterocitos, por lo que la Hepc obtenida a partir de Hep-G2 se ocupó para los experimentos posteriores, además de las Hepc PP2 y 3. Llama la atención que en este Seminario, el efecto inhibitorio de Hepc sobre la incorporación de Fe en células Caco-2 alcance un máximo de un 50% de la incorporación apical de hierro. Datos anteriores del laboratorio indican una inhibición máxima de un 70% utilizando el mismo sistema experimental. La falta de inhibición total indica que posiblemente hay otro sistema de incorporación de hierro insensible a Hepc. Alternativamente, podría ser que Hepc ejerciera inhibición sobre alguna y no todas las isoformas de DMT1. Por ejemplo, podría inhibir solo las isoformas +IRE, las más abundantes en células Caco-2. O simplemente la Hepc obtenida no era igualmente funcional.

7.2. Migración de Heps-25 marcada con ^{131}I bajo distintas condiciones.

Bajo condiciones estándar, Heps presentó una migración dispersa en geles de poliacrilamida-SDS. En un intento por obtener una migración más acotada, se probaron distintas condiciones de corrida tanto en el amortiguador de muestra como en el amortiguador de corrida. Primero se evaluó si la migración dispersa era debida a una reducción parcial de los puentes disulfuro de Heps. Comparando el perfil de migración de Heps en condiciones estándar con β -mercaptoetanol (**Figura 6, serie estandar**), sin reductor en el amortiguador de muestra (**Figura 6, sin reductor**) y con DTT 50 y 80 μM , en reemplazo del β -mercaptoetanol en el amortiguador de muestra (**Figura 6, series DTT**) concluimos que en condiciones estándar de electroforesis se logra un grado máximo de reducción de los puentes disulfuro de Heps, aunque no se puede concluir que los 4 puentes estén reducidos bajo estas condiciones. También parece ser que tanto β -mercaptoetanol como DTT evitan la presencia de un complejo intermolecular que tiene una migración dispersa con un pico de 22,5KDa, pico observado en ausencia de reductor.

Bajo la hipótesis de que la migración difusa de Heps se debe a que haya perdido solo parcialmente su estructura secundaria bajo condiciones estándar, posiblemente porque su particular estructura la hace más resistente al SDS, se subió a tres veces la concentración de SDS en el amortiguador de muestra (**Figura 6, serie SDS 6%**). No se observaron cambios en la migración con estas condiciones, indicando que posiblemente Heps ya se encuentra completamente denaturada en condiciones estándar.

Al ser Hepc un péptido catiónico (punto isoeléctrico: 8,2) y con una rígida estructura secundaria, es posible que el SDS no estuviera otorgándole la suficiente carga superficial negativa para una correcta migración al ánodo. Para probar esta hipótesis, se cambió el amortiguador de corrida de Tris-Glicina 25 mM pH 8,3 a Tris-Tricina 100 mM pH 8,5 (**Figura 6, serie Tris-Tricina**). Tris-Tricina es un amortiguador con una mayor capacidad de mantención de pH. El pH 8,5 está sobre el punto isoeléctrico teórico de Hepc, además tiene una mejor resolución para péptidos pequeños. Bajo estas condiciones tampoco se vio un cambio en el perfil de migración, lo que nos induce a pensar que el SDS le estaría otorgando una carga negativa adecuada para la migración al ánodo.

A partir de estos estudios, se puede establecer que lo más probable es que la migración anómala de Hepc no sea debido a una falta de poder reductor, ni a una carga negativa insuficiente. Quizás esta migración dispersa es producto del bajo peso molecular de Hepc que permitiría que difunda en el tiempo de corrida del gel.

7.3. Efecto del Fe en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2.

La adición apical de hierro en células Caco-2 induce la rápida internalización de DMT1 en la membrana apical (Ma et al., 2006). En este Seminario estudiamos el efecto de la concentración de hierro en el medio de cultivo sobre la distribución en las membranas apical y basolateral de los transportadores DMT1 y FPN. A medida que aumentan los niveles de Fe se observó una disminución significativa de DMT1 apical y también una leve disminución de FPN basolateral (no significativa), lo que concuerda

con la bibliografía (Mena et al., 2006). Además se observó que, a medida que la concentración de Fe aumentaba, DMT1 basolateral aumenta de manera significativa mientras que el cambio de FPN apical no llegó a ser significativo. Estos resultados son los esperados a una función homeostática, siendo la respuesta lógica para disminuir el flujo de hierro desde el medio apical al basolateral. Este experimento sirvió como control positivo para la utilización de la técnica de biotinización, validando este método para seguir los cambios en la distribución de los transportadores de Fe DMT1 y FPN en los dominios basolateral y apical de células Caco-2.

7.4. Efecto de Hepc en la redistribución de DMT1 y FPN en Caco-2.

Los tratamientos de 12 hr con Hpc sobre células Caco-2 tuvieron como efecto disminuir los niveles de DMT1 en la membrana apical. Estos resultados concuerdan con la hipótesis que Hpc afecta principalmente la incorporación apical de hierro (Mena et al., 2008). Llama la atención de estos resultados la falta de efecto sobre FPN basolateral, a pesar de que existe un mecanismo descrito a través del cual Hpc disminuye los niveles de FPN en las membranas de las células blanco al unirse e inducir la internalización y posterior degradación de FPN (Nemeth et al., 2004) (Delaby et al., 2005). A través de la degradación de FPN, Hpc controlaría la homeostasis del hierro disminuyendo el flujo de hierro desde el interior de las células hacia el plasma sanguíneo. Este modelo de acción de Hpc fue demostrado en líneas celulares como macrófagos y células de riñón, extrapolándose a todos los tipos celulares. Bajo esta línea de razonamiento, se esperaría que estuviera ocurriendo lo mismo en enterocitos, pero estos cumplen un rol particular en la homeostasis del hierro ya que son las únicas células

que median el ingreso de Fe desde el exterior del organismo. Trabajos anteriores establecen que Hcp tiene un efecto sobre DMT1 y no sobre FPN de enterocitos, llegando a la conclusión que el efecto de Hcp es célula específico (Mena et al., 2008) (Chaston et al., 2008). El presente trabajo va más allá, en el sentido de profundizar en donde, ya sea dominios de membrana apical o basolateral, se manifiestan estos cambios. Se llegó a la conclusión que Hcp induce cambios de DMT1 en la membrana apical del enterocito, disminuyendo de esta manera la incorporación de Fe. Esta es una respuesta homeostática que integra la regulación de los niveles de hierro circulante (macrófagos) con la regulación de los niveles de hierro corporal (enterocitos).

8. RESUMEN

8.1. Se obtuvo una preparación de Hephc a partir de medios condicionados de células HepG2 cuya actividad inhibió la incorporación apical de hierro en células Caco-2.

8.2. En geles de poliacrilamida-SDS Hephc migra con un peso molecular aparente de 6,2 \pm 1,0 KDa.

8.3. El uso de un reductor más fuerte (DTT) y una mayor concentración de SDS no generó un cambio en la migración electroforética de Hephc.

8.4. La naturaleza de péptido catiónico de Hephc no afectó su migración en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

8.5. Un aumento en la oferta de hierro indujo una disminución de DMT1 en la membrana apical y un aumento de este en la membrana basolateral.

8.6. El aumento en la oferta de hierro no produjo cambios significativos en la distribución apical-basolateral de FPN.

8.7. Hephc indujo una disminución en la cantidad de DMT1 de la membrana apical sin afectar su contenido en la membrana basolateral.

8.8. Tras 12 hr de incubación con Hephc no se observaron cambios en los niveles de FPN tanto en la membrana apical como en la basolateral.

9. CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos en este Seminario indican que en enterocitos Hpc induce la disminución de los niveles de DMT1 en la membrana apical lo que posiblemente podría resultar en una disminución del flujo de hierro desde el exterior del organismo hacia el interior, reduciendo de esta forma la ganancia de hierro corporal (**Figura 11**). Estos datos complementan las observaciones en macrófagos, en donde Hpc, al inducir la internalización y degradación de FPN, inhibe la reutilización del hierro proveniente de la degradación de eritrocitos senescentes, y de esta forma disminuyendo los niveles de hierro circulante. La siguiente figura es un mecanismo de acción propuesto de Hpc sobre enterocitos.

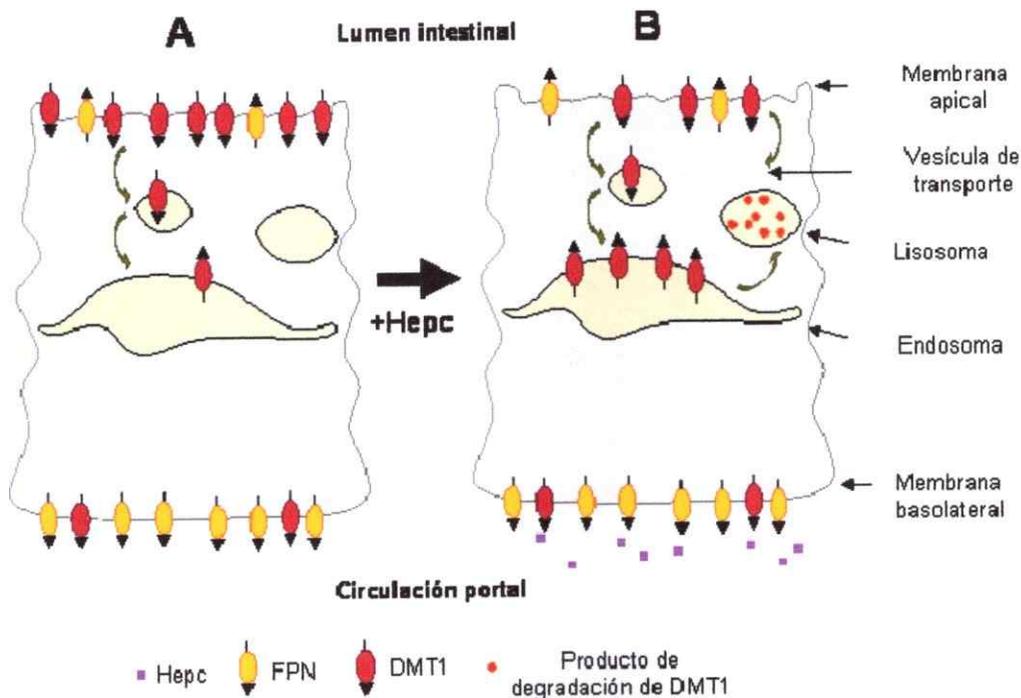


Figura 11: Mecanismo de acción de Hpc sobre enterocitos. A: Distribución de DMT1 y FPN en los dominios apical y basolateral de enterocitos no tratados con Hpc. B: Efecto de Hpc sobre enterocitos. Se postula que la disminución de DMT1 en el dominio apical es debida a un aumento en su internalización hacia lisosomas y/o compartimentos del sistema endocítico. Mediante este proceso Hpc bajaría la incorporación apical de Fe.

10. REFERENCIAS

Publicaciones:

- Abboud S, Haile DJ (A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275:19906-19912.2000).
- Andrews NC (Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:159-169.2005).
- Barb W, Baxendale J, George P, Hargrave K (Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. *Trans Faraday Soc* 47:462-500.1951).
- Barrios M, Gómez H, Fernandez N (metabolismo del hierro. *instituto de hematología e inmunología* 16:149-160.2000).
- Bartzokis G, Beckson M, Hance DB, Marx P, Foster JA, Marder SR (MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males. *Magn Reson Imaging* 15:29-35.1997).
- Bartzokis G, Tishler TA, Shin IS, Lu PH, Cummings JL (Brain ferritin iron as a risk factor for age at onset in neurodegenerative diseases. *Redox-Active Metals in Neurological Disorders* 1012:224-236.2004).
- Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD (1996) *Protein methods*. New York: Wiley-Liss.
- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genetics* 25:14-15.2000).
- Cazzola M (Genetic disorders of iron overload and the novel "ferroportin disease". *Haematologica* 88:721-724.2003).
- Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srani SK, Sharp P (Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 57:-.2008).
- Chevion M (A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med* 5:27-37.1988).
- Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F (Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood* 106:3979-3984.2005).
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI (Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776-781.2000).
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics* 13:399-408.1996).
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC (Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in

- endosomal iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1148-1153.1998).
- Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC (Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics* 16:383-386.1997).
- Fowler C (Hereditary hemochromatosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Crit Care Nurs Clin North Am* 20:191-201, vi.2008).
- Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ (Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 123:835-844.2002).
- Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S, Grone HJ, Hentze MW (Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metabolism* 7:79-85.2008).
- Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G (The Fenton Reagents. *Free Radical Biology and Medicine* 15:435-445.1993).
- Gunshin H, Allerson CR, Polycarpou-Schwarz M, Rofts A, Rogers JT, Kishi F, Hentze W, Rouault TA, Andrews NC, Hediger MA (Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *Febs Letters* 509:309-316.2001).
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488.1997).
- Guo B, Yu Y, Leibold EA (Iron Regulates Cytoplasmic Levels of a Novel Iron-Responsive Element-Binding Protein without Aconitase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 269:24252-24260.1994).
- Haber F, Weiss J (Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* 20:948-950.1932).
- Haber F, Weiss J (The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts *Proc R Soc London* 147:332-351 1934).
- Haber F, Willstatter R (Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge *Ber Deutsch Chem Ges* 64:2844-2856.1931).
- Hallgren B, Sourander P (The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* 3:41-51.1958).
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285-297.2004).
- Hofto LR, McKenna M, Cafiero M (PHYS 539-Evaluation of novel DFT methods for dispersion-like forces in protein-ligand systems. *Abstr Pap Am Chem S* 235:-1053.2008).
- Hubert N, Hentze MW (Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12345-12350.2002).
- Kaplan J (Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire. *Cell* 111:603-606.2002).
- Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D (Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 106:3268-3270.2005).
- Keyer K, Imlay JA (Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13635-13640.1996).

- Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K (LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480:147-150.2000).
- Laemmli UK (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.1970).
- Latunde-Dada GO, Van der Westhuizen J, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ, McKie AT (Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis* 29:356-360.2002).
- Lawless MW, Mankan AK, Norris S (Hereditary hemochromatosis should be considered a conformational disorder. *Med Hypotheses* 70:783-784.2008).
- Leibman A, Aisen P (Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum: methods and results in normal human subjects. *Blood* 53:1058-1065.1979).
- Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, Lou DQ, Ramey G, Houbron C, Hamard G, Kahn A, Vaulont S (Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood* 108:1402-1405.2006).
- Lesko SA, Lorentzen RJ, Ts'o PO (Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry* 19:3023-3028.1980).
- Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T (Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 110:2182-2189.2007).
- Ma YX, Yeh M, Yeh KY, Glass J (Iron imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *Am J Physiol-Gastr L* 290:G417-G422.2006).
- Martini LA, Tchack L, Wood RJ (Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr* 132:693-696.2002).
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ (A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell* 5:299-309.2000).
- Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdes P, Nunez MT (Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G192-198.2008).
- Mena NP, Esparza AL, Nunez MT (Regulation of transepithelial transport of iron by hepcidin. *Biol Res* 39:191-193.2006).
- Miret S, Simpson RJ, McKie AT (Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr* 23:283-301.2003).
- Muckenthaler M, Roy CN, Custodio AO, Minana B, deGraaf J, Montross LK, Andrews NC, Hentze MW (Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and *Cybrd1* expression in mouse hemochromatosis. *Nat Genet* 34:102-107.2003).
- Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW (Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 28:197-213.2008).
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J (Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090-2093.2004).

- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T (Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101:2461-2463.2003).
- Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8780-8785.2001).
- Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S (Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:4596-4601.2002).
- Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, Bennoun M, Beaumont C, Kahn A, Andrews NC, Vaulont S (Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet* 34:97-101.2003).
- Nunez MT, Tapia V, Rojas A, Aguirre P, Gomez F, Nualart F (Iron supply determines apical/basolateral membrane distribution of intestinal iron transporters DMT1 and ferroportin 1. *Am J Physiol-Cell Ph* 298:C477-C485.2010).
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP (Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36:77-82.2004).
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806-7810.2001).
- Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A (Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación *Acta Bioquím Clín Latinoam* 39:301-314.2005).
- Perry G, Sayre LM, Atwood CS, Castellani RJ, Cash AD, Rottkamp CA, Smith MA (The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders - Therapeutic implications. *Cns Drugs* 16:339-352.2002).
- Pietrangelo A (Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* 46:1291-1301.2007).
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276:7811-7819.2001).
- Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G (Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanita* 41:143-164.2005).
- Sayre LM, Perry G, Atwood CS, Smith MA (The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:731-741.2000).
- Schägger H, von Jagow G (Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-397.1987).
- Tchernitchko D, Bourgeois M, Martin ME, Beaumont C (Expression of the two mRNA isoforms of the iron transporter Nrmap2/DMT1 in mice and function of the iron responsive element. *Biochemical Journal* 363:449-455.2002).

- Thomas C, Oates PS (Ferroportin/IREG-1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes. *Gut* 53:44-49.2004).
- Toyokuni S (Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Rep* 7:189-197.2002).
- Uzel C, Conrad ME (Absorption of heme iron. *Seminars in Hematology* 35:27-34.1998).
- Wachtershauser G (Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol Rev* 52:452-484.1988).
- Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS (Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1763:668-689.2006).
- Weiss J (Elektronenübergangsprozesse im Mechanismus von Oxydations- und Reduktionsreaktionen in Lösungen. *Naturwissenschaften* 23:64-69 1935).
- Yang FM, Wang XC, Haile DJ, Piantadosi CA, Ghio AJ (Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283:L932-L939.2002).
- Zhang DL, Hughes RI, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA (A Ferroportin Transcript that Lacks an Iron-Responsive Element Enables Duodenal and Erythroid Precursor Cells to Evade Translational Repression. *Cell Metab* 9:461-473.2009).
- Zoller H, Theurl I, Koch R, Kaser A, Weiss G (Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1. *Blood Cells Molecules and Diseases* 29:488-497.2002).