

UCH-FC
Biotecnología
A729
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**ANALISIS DE LA EXPRESION DE FERRITINA MITOCONDRIAL Y
FERRITINA CITOSOLICA EN UN MODELO PROGRESO DE
ACUMULACION DE HIERRO EN CELULAS NEURONALES**

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

Enrique Armijo Fuentes



Director de Seminario de Título: Dr. Marco Tulio Núñez

Enero, 2009
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.:

ENRIQUE ANTONIO ARMIJO FUENTES

“ANALISIS DE LA EXPRESION DE FERRITINA MITOCONDRIAL Y FERRITINA CITOSOLICA EN UN MODELO PROGRESO DE ACUMULACION DE HIERRO EN CELULAS NEURONALES”

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 Núñez González
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Christian González-Billault
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.



Dra. Alejandro Roth Metcalfe
Correctora

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, enero 2009.



Nací el 19 de Diciembre de 1983 en la ciudad de Puerto Ordaz, Venezuela. Allí viví por 5 años hasta que mis padres deciden volver a Chile. De esta etapa quedan recuerdos de un país hermoso y de personas cariñosas que se han transformado en mi familia y con las cuales hasta el día de hoy tengo una gran cercanía.

Mis primeros años de estudios los realicé en el Colegio Claretiano, pero gracias a la buena decisión de mis padres, entré al Instituto Nacional “José Miguel Carrera”, donde continué mis estudios desde 7° básico hasta 4° Medio. Los primeros años fueron difíciles, la exigencia era alta y mis capacidades un poco limitadas. Pero con esfuerzo y perseverancia pude estar dentro de los mejores alumnos de mi curso. Además de entregarme las primeras herramientas para poder enfrentar de mejor manera los desafíos académicos, el Instituto me permitió conocer a grandes personas que hasta hoy siguen siendo mis amigos y con los cuales comparto penas, alegrías y proyectos.

Es aquí donde mi interés por el área biológica se hace evidente influido por profesores que demostraban y transmitían la pasión por la investigación. Mis intenciones iniciales eran estudiar Odontología, pero el destino me tenía preparado otro camino. Mi atención durante 4° Medio se centro en la salud de mi padre. Fue un año difícil y la posibilidad que no estuviera más a mi lado hizo que la famosa P.A.A. se transformara en un trámite insignificante al lado del sentimiento de pérdida.

En el año 2002, entré a la carrera Biología Ambiental elección influida por mis padres y mis amigos Sebastian y Gabriel. Las intenciones por estudiar Odontología quedan en el pasado y el interés por la investigación se ve potenciado por los cursos de Biología Celular y Química General. Es acá donde conozco a mi amigo Jorge, con el cual compartí mis intenciones de cambiarme de carrera e ingresar a Ing. en Biotecnología. Con la condición de obtener buenas notas, en el año 2003 nos matriculamos en Biotecnología.

Durante los años de pregrado conocí a grandes personas que se transformaron en grandes amigas y amigos, como Claudia, Rosario, German, Fabián y Kury. Lamentablemente hoy la rutina nos ha distanciado un poco, pero los buenos momentos no se olvidan. En mis años de estudios surge el interés por investigar el envejecimiento celular, es por esto que acudo al Dr. M. Tulio Núñez. Es acá donde conozco a personas como Pabla que con su paciencia, dedicación y constancia me enseñaron a trabajar en el laboratorio. Desde el año 2006, he tenido el agrado de trabajar con Natalia, disfrutar de los análisis de los resultados y la pasión por la ciencia.

Es en esta facultad y en el laboratorio Dr. Núñez en donde he podido hacer realidad parte de mis sueños, en donde he aprendido a enfrentar los problemas con entusiasmo y valentía, y en donde he encontrado a personas que han hecho más feliz mi vida.



A mis padres, Enrique y Rebeca, quienes con amor y sacrificio me han ayudado a seguir adelante, han estado siempre a mi lado y me han puesto de pie cada vez que he caído.

A mis amigos quienes han sido un apoyo en mi camino.

A Natalia quien ha sido mi guía en los laberintos del conocimiento.

A mi fuente de inspiración y motivación.



AGRADECIMIENTOS



Al Dr. Marco Tulio Núñez, por darme la libertad para investigar, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por los buenos momentos y su compañía: Vicky, Elmer, Carola C., Carola Garric, Pame Valdés, Pamela Urrutia, Daniel Bórquez, Daniela, Francisco, Pablo Muñoz, Flaco Valdés, Carol San Martín, Andrés y en especial a Pabla Aguirre quien con mucha paciencia me enseñó a trabajar en los inicios de mi formación en el laboratorio.

A Natalia Mena, por su gran amistad, cariño, compañía, confianza y compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos. Por su influencia en mi crecimiento personal y profesional.

A mis amigos del Instituto Nacional en especial a Gabriel y Sebastian "Chino", por su amistad y su compañía por largos años.

A mis compañeros y amigos de curso en especial a Claudia, German y Rosario con quienes construimos conocimiento, compartimos mañanas, tardes y noches de estudio, por su amistad y compañía.

A Jorge Vera, por su gran amistad, los buenos momentos y la lucha por aprender a superar la frustración de los experimentos fallidos.

A mi tía Jovita y primos Pedro, Sergio, Pablo, Nicole y Anaís por su alegría y preocupación.

A mis abuelitas Jova y Azucena por su cuidado y cariño.

A mis padres, por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos.

A mi familia y amigos que han comprendido mis "ausencias" por estudio y trabajo.

A mi comisión de evaluación en especial al Dr. Alejandro Roth por sus críticas, su buena disposición y por darle la importancia que merece este proceso en mi formación.

INDICE DE CONTENIDO



1. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes Bibliográficos	1
1.1.1 Importancia Biológica del Hierro	1
1.1.2 Estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno y el hierro como productor de ROS	2
1.1.3 Transporte, almacenamiento y regulación traduccional de la homeostasis del hierro	4
1.1.4 Proteínas de Almacenaje de hierro	8
1.1.4.1 Ferritina Citosólica (cFt), estructura, funcionalidad y regulación transcripcional	8
1.1.4.2 Ferritina Mitocondrial (MtFt), estructura y funcionalidad	11
1.1.5 Acumulación de hierro en el cerebro	14
1.2 Hipótesis	18
1.3 Objetivo General	18
1.4 Objetivos Específicos	18
2. MATERIALES Y METODOS	20
2.1 MATERIALES	20
2.1.1 Reactivos Generales	20
2.1.2 Cultivo Celular	20



2.1.3 Material Biológico	21
2.1.4 Anticuerpos y Western Blot	22
2.1.5 Fluoróforos	22
2.1.6 Equipos	22
2.2 METODOS	23
2.2.1 Cultivo Celular	23
2.2.2 Tratamientos con Hierro células SH-SY5Y	23
2.2.3 Expresión del ARNm de MtFt, cFtH en células SH-SY5Y expuestas a diferentes tratamientos con hierro extracelular	24
2.2.4 Aislamiento de mitocondrias	26
2.2.5 Western Blots del extracto celular y la fracción mitocondrial de células SH-SY5Y	27
2.2.6 Determinación inmunocitoquímica de ferritina mitocondrial en células de cultivo	29
2.2.7 Medio de cultivo MEM/F12 10% FBS bajo en hierro y distribución subcelular de la incorporación de hierro al equilibrio utilizando el isótopo ⁵⁵ Fe	30
3. RESULTADOS	32
3.1 El contenido de hierro en el medio extracelular regula los niveles de la proteína y no del ARNm de cFtH	32
3.2 El contenido de hierro en el medio extracelular regula la expresión del ARNm y de proteína de MtFt	35
3.2.1 Aumento de la expresión del ARNm de MtFt en condiciones de deficiencia y sobrecarga de hierro	36
3.2.2 Aumento en los niveles de proteína de MtFt en condiciones de deficiencia y sobrecarga de hierro	37

3.3 Inmunocitoquímica de MtFt	40
3.4 Distribución subcelular de la incorporación de hierro al equilibrio utilizando el isótopo ^{55}Fe	44
4. DISCUSION	47
4.1 Rol de cFt en células neuronales expuestas a diferentes tratamientos de hierro extracelular	48
4.2 Rol MtFt en células neuronales expuestas a diferentes tratamientos de hierro extracelular	51
4.3 Distribución subcelular del hierro en neuronas	55
5. CONCLUSIONES	57
6. REFERENCIAS	58



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de la Tf	5
Figura 2 Regulación transcripcional de Tf y de cFt.	7
Figura 3 Representación de cFt.	10
Figura 4 El hierro no induce cambios en la expresión del ARNm de cFt.	33
Figura 5 El hierro induce la expresión de la proteína cFt en condiciones de sobrecarga de este metal.	35
Figura 6 El hierro induce la expresión del ARNm de MtFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga de este metal.	37
Figura 7 El hierro induce la expresión de la proteína MtFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga de este metal.	39
Figura 8 La deficiencia y la sobrecarga de hierro inducen un aumento inicial en la expresión de MtFt en células SH-SY5Y.	41
Figura 9 La deficiencia y la sobrecarga de hierro inducen un aumento en la expresión de MtFt en células SH-SY5Y.	42
Figura 10 El hierro no induce un aumento en la expresión de MtFt en condiciones prolongadas de tratamiento en células SH-SY5Y.	43
Figura 11 Distribución subcelular de hierro en células SH-SY5Y.	46
Figura 12 Modelo de expresión de MtFt en neuronas expuestas a variadas concentraciones de hierro extracelular	54

ABREVIATURAS

ADN	: Acido desoxiribonucleico.
ADNc	: Acido desoxirribonucleico complementario.
ARNm	: Acido ribonucleico mensajero.
DFO	: Quelante desferroxamina
DMT1	: Transportador de metales divalentes.
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético.
cFt	: Ferritina Citosólica.
cFtH	: Sub-unidad pesada de cFt.
cFtL	: Sub-unidad liviana de cFt.
IgG	: inmunoglobulina G.
IRE	: Elemento de respuesta a hierro.
IRPs	: Proteínas reguladoras de hierro 1 y 2, IRP1 y IRP2.
LIP	: Pool de hierro lábil o reactivo.
MtFt	: Ferritina Mitocondrial.
NTA	: Acido Nitrilotriacetico
O ₂ ⁻	: Radical superoxido.
·OH	: Radical hidroxilo.
PBS	: Solución tampón de fosfato salino.
ROS	: Especies reactivas del oxígeno.
SH-SY5Y	: Línea celular de neuroblastoma humano.
Tf	: Transferrina.
TfR	: Receptor de transferrina

RESUMEN

El hierro es un elemento esencial para el normal funcionamiento celular, participando en reacciones de oxido-reducción cediendo o captando un electrón en forma reversible. En el ambiente reductor intracelular, el Fe^{2+} reacciona con el peroxido de hidrogeno generando el radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) mediante la reacción de Fenton. Debido a que el hierro es un metal potencialmente tóxico, su incorporación, almacenaje y movilización son altamente regulados. El descubrimiento de proteínas mitocondriales implicadas en la homeostasis celular del hierro, como ferritina mitocondrial (MtFt), una nueva ferritina similar a la sub-unidad H de ferritina citosólica (cFt); sugiere un mayor nivel de complejidad del metabolismo celular y mitocondrial de este metal. La expresión de MtFt esta restringida a células con elevada actividad respiratoria, como espermatozoides y neuronas. Se postula que la principal función asociada a esta proteína es el secuestro del exceso de hierro y la protección del daño oxidativo. Esta función al interior de la mitocondria es de principal interés, ya que en estos organelos se realiza la síntesis de grupos hem y complejos Fe-S y por lo tanto están expuestos a un tráfico importante de hierro.

En este Seminario de Título se estudió la expresión de MtFt y cFt como función de la oferta de hierro extracelular en células neuronales. Se encontró que ambas ferritinas tienen mecanismos propios de control de su expresión. En particular, a diferencia de cFt, la expresión de MtFt aumentó en respuesta a condiciones de bajo hierro, una respuesta que podría asegurar un suministro adecuado de hierro a la mitocondria bajo condiciones de deficiencia del metal.

SUMMARY

Iron is an essential element required for normal cell function, it participates in redox reactions by reversely donating or receiving an electron. In the reducing conditions of intracellular environment, iron reacts with hydrogen peroxide and generates the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) through the Fenton reaction. Therefore, because of its potentially toxic properties, cells tightly regulate iron uptake, storage and mobilization. The recent discovery of mitochondrial proteins implicated in iron homeostasis, such as mitochondrial ferritin (MtFt), a novel ferritin H chain-like protein; suggest a level of complexity of cellular and mitochondrial iron metabolism not previously imagined. In contrast to cytosolic ferritin (cFt), MtFt expression correlates with cellular mitochondrial number rather than iron storage capacities, presenting higher expression in testis and neuronal cells rather than liver cells. It has been suggested that the role of MtFt is protection against oxidative damage in the mitochondria. Its function in the mitochondria is extremely important since this organelle is the site of heme and Fe-S cluster synthesis. Thus, iron in mitochondria must be available for synthesis and controlled for its potential oxidative damage.

In this Seminar, we studied the expression of MtFt and cytosolic ferritin (Ft) in neuronal cells. We found that these proteins have differential control mechanisms. In particular, and unlike cFt, MtFt was expressed at levels higher than control when cells were placed in low iron conditions, a response that may help to secure an adequate supplement of iron.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes Bibliográficos

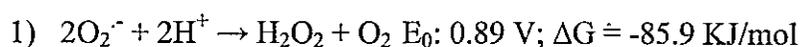
1.1.1 Importancia Biológica del Hierro

El hierro es un elemento crítico para el normal funcionamiento celular, actuando como cofactor de muchas proteínas que participan en vías biológicas vitales para el desarrollo y función de órganos como el cerebro, incluyendo la síntesis de ATP y fosforilación oxidativa, la síntesis de ADN, formación de mielina y la síntesis y metabolismo de los neurotransmisores dopamina, serotonina, norepinefrina y ácido γ -aminobutírico (Youdim y col., 1990; Hill, 1985; Wu y col., 2004).

El hierro participa en los procesos metabólicos experimentando reacciones de oxido-reducción, una propiedad común entre los metales de transición, la cual permite a este metal sufrir interconversión entre los estados de catión divalente o ferroso (Fe^{2+}) y el catión trivalente o férrico (Fe^{3+}) (Papanikolaou y Pantopoulos, 2005). La habilidad de donar y aceptar electrones en estas reacciones no sólo contribuye al rol crítico del hierro en procesos fisiológicos, sino que también puede guiar a un importante estrés oxidativo celular mediante la producción de radicales libres a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Wardman y Candeias, 1996) cuando un exceso de este metal esta presente.

1.1.2 Estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno y el hierro como productor de ROS

El estrés oxidativo es generalmente definido como un desbalance entre estímulos pro y anti-oxidantes que favorece la producción de especies reactivas (RS) por sobre las defensas antioxidantes, guiando a un daño oxidativo. Entre las RS se incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), halógenos reactivos y especies sulfuro-reativas. Las ROS incluyen a radicales de oxígeno y derivados no radicales del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el ozono (O_3). El precursor de gran parte de las ROS es el radical libre anión superóxido (O_2^-), el cual posee un electrón no apareado y es el producto de la reducción incompleta del oxígeno molecular (O_2) producido durante la respiración mitocondrial normal (Chance y col., 1979). La posterior dismutación del O_2^- de manera espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), produce la reducción de O_2^- en H_2O_2 (1).

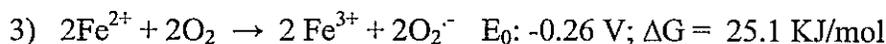


El H_2O_2 es débilmente reactivo y capaz de atravesar membranas celulares participando en procesos de transducción de señales. A pesar de su poca reactividad, el H_2O_2 puede ser citotóxico y aunque una pequeña parte del daño celular mediado por H_2O_2 es directo, por ejemplo la inactivación de la enzima glicolítica G3PDH (Brodie y Reed, 1987), el H_2O_2 es capaz de producir la oxidación de lípidos, ADN y proteínas debido a la reacción con hierro.

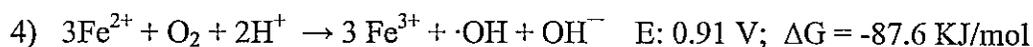
El hierro es productor de radicales libres mediante una reacción no-enzimática conocida como reacción de Fenton, en donde el hierro en su estado reducido (Fe^{2+}) media la conversión de H_2O_2 al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el que es altamente reactivo (2).



Similarmente, el ambiente reductor intracelular favorece la reacción entre Fe^{2+} y oxígeno molecular, generando el anión superóxido en una reacción conocida como reacción de Haber-Weiss (3).



Estas tres reacciones conforman la base de la relación Fe/ROS en ambientes intracelulares. Su acoplamiento resulta en la reacción 4 (la cual es altamente favorable), la que establece la relación entre hierro y la producción del radical hidroxilo.



La forma oxidada de hierro (Fe^{3+}) producido en las reacciones 2) y 3) es nuevamente reducido por reductores celulares, como O_2^- , ascorbato y glutatión reducido (GSH), comportándose como catalizadores de la producción de los radicales libres hidroxilo y anión superóxido.

1.1.3 Transporte, almacenamiento y regulación traduccional de la homeostasis del hierro

En el plasma sanguíneo el hierro es transportado principalmente como Fe^{3+} asociado a la proteína de unión a hierro, Transferrina (Tf), una proteína que puede transportar 1 ó 2 átomos de hierro por molécula (HoloTf). Después de la unión de la HoloTf a su receptor (TfR) presente en la membrana plasmática, se produce la internalización del complejo HoloTf-TfR hacia el citosol a través de vesículas endocíticas (Richardson y Ponka, 1997). El hierro presente en la HoloTf es liberado en un compartimiento endosomal acidificado, para luego ser transportado a través de la membrana endosomal hacia el citosol por el transportador de metales divalentes (DMT1 o DCT1, Nramp2) (Andrews, 1999). Este hierro luego puede: (i) formar parte del pool de hierro lábil citosólico (cLIP, Labil Iron Pool) o hierro reactivo citosólico, (ii) ser destinado hacia la mitocondria, para abastecer a este organelo de hierro para la síntesis de grupos hem y complejos hierro-azufre o (iii) ser almacenado en el citosol, por la proteína Ferritina (cFt) (Harrison y Arosio, 1996). La Tf libre de hierro (ApoTf) es transportada unida a TfR, hacia la membrana plasmática, donde es liberada a la circulación para un nuevo ciclo de movilización y entrega de hierro (Figura 1).

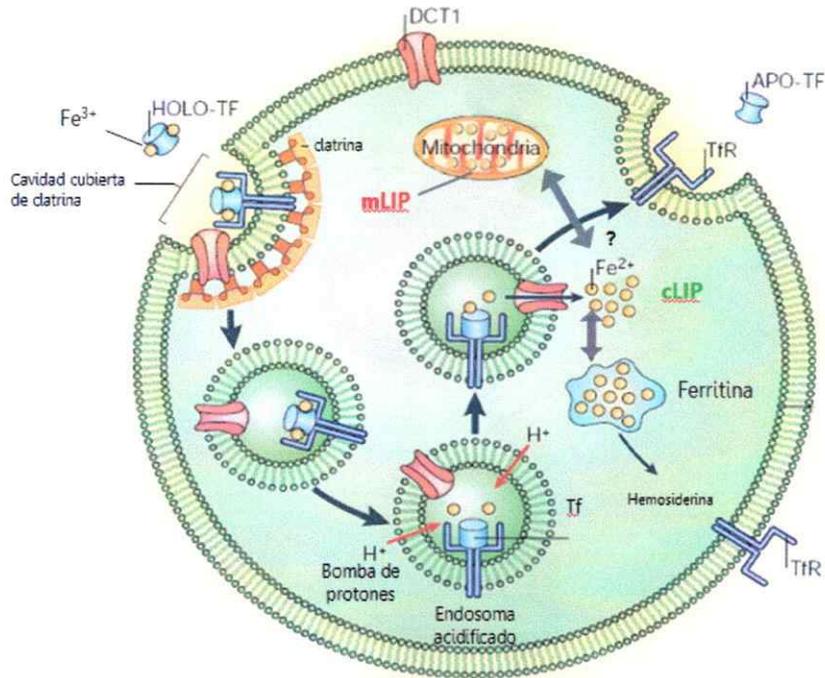


Figura 1 | Ciclo de la Tf. La HoloTf se une a su receptor, TfR, en la superficie celular. Este complejo (HoloTf-TfR) se localiza en una cavidad cubierta de clatrina, la membrana se invagina iniciando la internalización mediante endocitosis. La acidificación del endosoma, mediado por una bomba de protones, es necesaria para la liberación del hierro desde Tf, el cual es transportado fuera del endosoma por el transportador DMT1. La ApoTf es devuelta a la membrana celular unida a TfR, donde, a pH neutro, se disocia para participar nuevamente de ciclos de entrega de hierro. El hierro entregado puede ser transportado a la mitocondria o ser almacenado en la forma de cTf y hemosiderina en el citosol. cLIP (Pool de hierro reactivo citosólico). mLIP (Pool de hierro reactivo mitocondrial) (Modificado de Zecca y col., 2004).

Debido a que el hierro es un metal potencialmente tóxico, su incorporación, almacenaje y movilización son altamente regulados. Este mecanismo de control homeostático es realizado principalmente por proteínas que registran la disponibilidad del metal a través de interacciones directas con el hierro presente en el citosol. Estas proteínas de unión a ARN, conocidas con el nombre de proteínas reguladoras de hierro 1 y 2 (IRP1 e IRP2, de **I**ron **R**egulatory **P**rotein) y que en conjunto son denominadas IRPs, son responsables del control post-transcripcional de los ARN mensajeros de proteínas involucradas en el metabolismo celular del hierro. Este control se ejerce a través de la

asociación de las IRPs con sitios altamente conservados, conocidos como elementos de respuesta a hierro (IREs de Iron Responsive Element) presentes en la región 5' y 3' no traducida (UTR de Untranslated Region) de un ARNm (Hentze y Kühn, 1996). Estas proteínas, permiten ajustar rápidamente las concentraciones de hierro reactivo citosólico y optimizar la función de numerosos componentes celulares dependientes de hierro (Hentze y Kühn, 1996). La unión de estas proteínas a un IRE presente en el 5' UTR, como en el ARNm de las sub-unidades de cFt, controla la unión de los ribosomas al ARNm, pero cuando un IRE esta presente en el 3' UTR, como en el ARNm de TfR, la síntesis de proteína es controlada a través de la degradación del ARNm. Un aumento en los niveles del hierro citosólico guía a la formación de un complejo [4Fe-4S], presente en el sitio activo de IRP1, previniendo la unión de esta proteína a IREs localizados en el 5' UTR, así los niveles de las sub-unidades de cFt son traducidos libremente. Además, los ARNm de TfR y de otros transcritos que tienen un IRE localizado en el 3' UTR son degradados por endonucleasas no caracterizadas. Un aumento en los niveles de hierro citosólico guía a la degradación de IRP2 de manera hierro-dependiente, y su actividad no es regulada por un cambio en los complejos hierro-azufre (Rouault, 2006). Inversamente, una disminución del hierro citosólico guía al desensamblaje del complejo [4Fe-4S] lo que promueve un aumento en la actividad de unión de las IRPs a IRE con la consecuente disminución en cFt y un aumento de TfR (Figura 2).

Nuestro laboratorio analizó el efecto del exceso de hierro en la activación de IRP-1. Se encontró que IRP-1 tiene una respuesta bimodal. En células de epitelio intestinal (Caco-2), hepáticas (HepG2) y en células de neuroblastoma de ratón (N2A), IRP-1 se activa tanto en deficiencia de hierro como en exceso. La activación a concentraciones superiores a 20

μM de hierro en células N2A es inhibida por antioxidantes, estableciendo un posible rol oxidante del hierro en la activación de IRP1. Esta activación va acompañada del paradójico aumento de la incorporación de hierro, que se postula sería un mecanismo suicida de la célula ante el estrés oxidativo (Núñez y col., 2003). Esto explica las observaciones que a lo largo de la vida o en células expuestas a tratamientos con hierro este metal se acumula intracelularmente (Stohs y Bagchi, 1995; Tapia y col., 1996; Sturm y col., 2003) y a pesar de aumentar la concentración de cFt, el pool celular de hierro reactivo se incrementa con la exposición a hierro (Tapia y col., 1996; Arredondo y col., 1997).

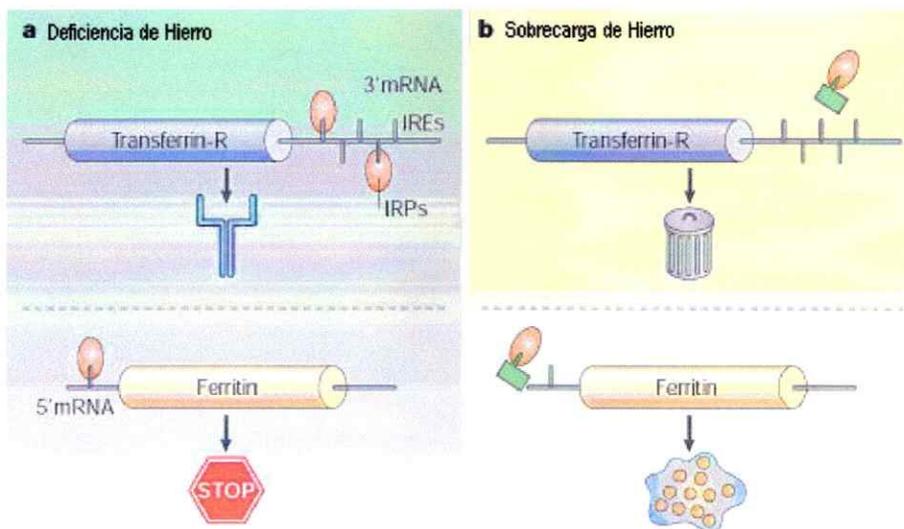


Figura 2 | Regulación post-transcripcional de Tfr y de cFt. Los niveles de las proteínas Tfr y de cFt son regulados post-transcripcionalmente. Las proteínas reguladoras de hierro, IRPs, se unen a los elementos de respuesta a hierro, IREs, localizados en la región 3' y 5' no traducida de los ARNm de Tfr y cFt, respectivamente. **a** | En deficiencia de hierro, las IRPs se unen a los IREs, protegiendo el ARNm de Tfr de la digestión por endonucleasas y previniendo la síntesis de ferritina. **b** | Cuando el hierro es abundante, el IRP modificado no se une a los IREs – en IRP1 el sitio de unión es bloqueado por la formación de un complejo 4Fe-4S (rectángulo verde), mientras que la proteína IRP2 es degradada en el proteosoma - permitiendo que el ARNm de Tfr sea degradado y permitiendo la expresión de ferritina (Modificado de Zecca y col., 2004).

1.1.4 Proteínas de Almacenaje de hierro

1.1.4.1 Ferritina Citosólica (cFt), estructura, funcionalidad y regulación transcripcional

La baja solubilidad de Fe^{3+} en condiciones fisiológicas (aprox. 10^{-18} M) ha permitido a los organismos vivos a adoptar mecanismos eficientes de transporte y almacenamiento del metal. Para superar este obstáculo, la proteína cFt permite el secuestro y la mantención del hierro en una forma no tóxica y biodisponible. Las cFts se desarrollaron filogenéticamente temprano y están presentes en arqueobacterias, eubacterias, plantas, invertebrados y mamíferos. Las secuencias de ADN y proteína para ferritinas^s varían, especialmente en bacterias, pero sus estructuras terciarias y cuaternarias están conservadas. En bacterias y plantas, las cFts están compuestas de 24 sub-unidades del mismo tipo, sin embargo, en mamíferos existen dos tipos de sub-unidades una pesada H (cFtH) y una liviana L (cFtL). Dependiendo del tipo celular, cFtH y cFtL se co-ensamblan en diferentes razones para formar una molécula multimérica de 24 sub-unidades (Andrews y col., 1992). La molécula de cFt es una esfera ahuecada con un diámetro externo de 12 a 13 nm. La cavidad central de cFt, de 7 a 8 nm de diámetro, es el sitio de almacenaje del hierro y es capaz de adquirir hasta aproximadamente 4.500 átomos de hierro, aunque su saturación normal es de 800 a 1000 átomos de hierro por molécula (Figura 3). Para ser almacenado, el hierro en el estado de oxidación Fe^{2+} entra a la cavidad central de cFt a través de canales hidrofóbicos. La posterior oxidación a Fe^{3+} , llevada a cabo por la sub-unidad cFtH, permite su mineralización. Bajo condiciones de bajo hierro citosólico, el hierro almacenado al interior

de cFt es reducido a Fe^{2+} y es transportado al exterior de cFt (Harrison y Arosio, 1996) aunque a una menor velocidad que la de entrada (Liu y col., 2007).

cFtH (21 kDa) contiene la actividad ferroxidasa responsable de la rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Los siete residuos de aminoácidos que contribuyen a la formación del centro ferroxidasa están conservados en todas las cFts, con excepción de la sub-unidad cFtL (19 kDa) que posee la particularidad de ofrecer residuos de aminoácidos ácidos en la superficie de la cavidad que facilitan la nucleación y mineralización del hierro. cFts enriquecidas en cFtL son asociadas al almacenamiento de hierro, mientras que cFts enriquecidas en cFtH son asociadas a respuesta a estrés (Zecca y col., 2004). En el cerebro, cFts enriquecidas en cFtH se encuentran predominantemente en neuronas, cFts enriquecidas en cFtL se encuentran predominantemente en microglías, mientras que oligodendrocitos expresan cantidades similares de ambas sub-unidades (Connor y col., 1994). Una baja expresión de cFt es observada en astrocitos, indicando que estas células tienen poca capacidad de almacenamiento de hierro (Zecca y col., 2004).

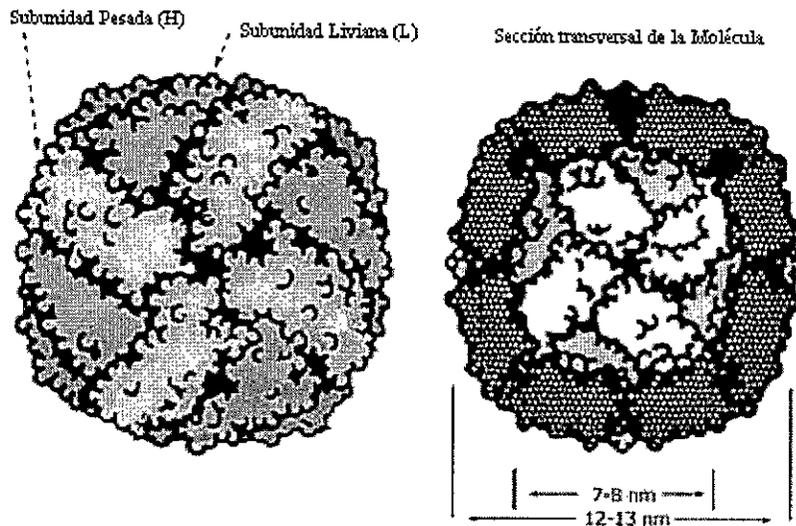


Figura 3 | Representación de ferritina (Ft). cFt es una proteína esférica que consiste de 24 sub-unidades (o cadenas peptídicas) plegadas en elipsoides, conectadas a través de uniones no covalentes. Los dos tipos de sub-unidades, una pesada cFtH y una liviana cFtL, forman una esfera ahuecada de aproximadamente 7 a 8 nm de diámetro interno y un diámetro externo de aproximadamente de 12 a 13 nm que es capaz de secuestrar y mantener en solución hierro en una forma no tóxica y biodisponible (Modificado de Kalantar-Zadeh K y col., 2006).

El énfasis de los estudios de regulación de cFt se han centrado en el la regulación post-transcripcional (IRE-IRP) del ARNm de cFt en respuesta a la exposición a variadas concentraciones de hierro extracelular. Sin embargo, variados estudios han observado regulación de los genes de cFtH a nivel transcripcional mediado por citoquinas (Torti F.M. y Torti S.V., 2002), por oxidantes como el H_2O_2 (Tsuji y col., 2000) y por inductores de la respuesta antioxidante de fase II como t-butilhidroquinona (t-BHQ), oltipraz y 1,2-ditio1-3-tion (D3T) (Pietsch y col., 2003). La inducción de la transcripción mediada por hierro del gen de cFtL, y no de cFtH, ocurre solamente luego de la exposición crónica a dosis de hierro extremadamente elevadas y ha sido determinado en células HeLa y ratas mediante el ensayo de transcripción run-on (nuclear run-on assay) (White y Munro, 1988; Cairo y col., 1985), mediante Northern blots en ratas y ranas (Dickey y col., 1987; Leggett y col., 1993)

y mediante análisis de microarrays (Muckenthaler y col., 2003). El tratamiento con el quelante de hierro desferroxamina (DFO) produce una disminución específica de los niveles de ARNm de cFtL. El mecanismo de regulación diferencial de cFtH y cFtL mediado por hierro es aún desconocido. En la actualidad, los efectos de la exposición a elevados niveles de hierro estarían relacionados con el daño oxidativo iniciado por hierro, en vez de una respuesta directa al hierro. cFt en conjunto con otros genes de respuesta antioxidante y detoxificación posiblemente permiten una defensa concertada en contra de insultos oxidativos (Balla y col. 1992; Torti y Torti, 2002; Hintze y Theil 2006).

1.1.4.2 Ferritina Mitocondrial (MtFt), estructura y funcionalidad

Desde su descubrimiento, la mitocondria es reconocida como un componente esencial y dinámico de la bioquímica celular. La mitocondria es un organelo central en varias funciones celulares incluyendo la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, la homeostasis intracelular de Ca^{2+} (Giorgi y col., 2008) y hierro, biosíntesis de grupos hem y complejos Fe-S, pirimidinas y esteroides. Son las responsables de la formación de la mayor parte de los ROS (Brookes y col., 2004) y actúan como los ejecutores en la apoptosis mediante la liberación de varias proteínas que inician la muerte celular programada (Garrido y Kroemer, 2004). Las neuronas son particularmente dependientes de la función mitocondrial y del suministro de oxígeno debido a los elevados niveles de actividad y la subsecuente necesidad de energía para la neurotransmisión y la mantención de los gradientes iónicos a través de la membrana celular (Ames, 2000; Erecinska y col., 2004). En consecuencia, una disfunción mitocondrial tiene efectos

devastadores en la integridad celular y podría estar involucrada en el envejecimiento, en las enfermedades metabólicas y degenerativas, así como también en el cáncer (Wallace, 2005).

La complejidad de la mitocondria ha sido gradualmente revelada por el estudio y la caracterización de los defectos moleculares involucrados en una variedad de enfermedades genéticas humanas, las cuales han revelado las posibles vías del tráfico de hierro desde y hacia la mitocondria. Entre las enfermedades relacionadas con disfuncionalidad mitocondrial, el estudio de las enfermedades Ataxia de Friedreich (FA) y anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, XLSA/A (X-linked sideroblastic anemia) han entregado resultados relevantes para comprender el metabolismo del hierro mitocondrial y celular. En ambas, se produce la acumulación mitocondrial de hierro especialmente en tejidos con elevado número de mitocondrias, como el tejido nervioso y cardíaco (Puccio y col., 2001; Pandolfo, 2002; Bekri y col., 2000). Un exceso de hierro libre en el ambiente mitocondrial en pacientes con FA y XLSA/A ha sugerido un rol esencial del hierro en la patogénesis de estas enfermedades. El uso de quelantes de hierro y de neutralizadores de radicales libres (free-radical scavengers) han mostrado efectos protectores frente a cardiomiopatías y neuropatías (Wong y col., 1999; Rustin y col., 1999). Esto explicaría la participación del hierro en el daño de moléculas biológicas mitocondriales el que sería originado por una sobrecarga de este metal y/o la alteración de la homeostasis mitocondrial del hierro en células cardíacas y neuronales (Chaston y Richardson, 2003). Es por esto que el hierro jugaría un rol crucial en muchos aspectos del metabolismo de la mitocondria y los efectos de una interrupción de estas vías podrían ser catastróficos. En consecuencia, la mitocondria debería poseer suficientes medidas para el control del tráfico y el metabolismo del hierro. El conocimiento del metabolismo del hierro en la mitocondria ha sido confinado

mayoritariamente al estudio de los intermediarios en la síntesis de grupos hem en células eritroides y muy poco se conoce acerca de las vías de tráfico y almacenamiento del hierro en este organelo en otros tipos celulares (Napier y col, 2005). El reciente descubrimiento de proteínas mitocondriales involucradas en el metabolismo del hierro como frataxina, mitoferrina1/2, el transportador ABCB6/7 y ferritina mitocondrial (MtFt) ha generado un marcado incremento en las investigaciones en este campo (Napier y col., 2005).

MtFt es una proteína de almacenamiento de hierro perteneciente a la familia de las Fts (Levi y col. 2001). Fue nombrada como ferritina mitocondrial luego de la demostración de que se localiza específicamente en la mitocondria (Levi y col., 2001). Homólogos mitocondriales de la proteína han sido encontrados en primates, ratón, rata, en plantas (Zancani y col., 2004) y muy recientemente en *Drosophila* (Missirlis y col., 2006). MtFt humana es codificada por un gen sin intrones localizado en el cromosoma 5q23.1 que codifica un ARNm de ~1kb. Los ARNm de MtFt de humano no poseen la secuencia IRE consenso para el control post-transcripcional dependiente de hierro (Levi y col. 2001). Así, la expresión de MtFt no es regulada por la maquinaria IRE-IRP, la cual controla la homeostasis del hierro celular. La traducción de MtFt genera un precursor de 242 amino ácidos (30 kDa) (Drysdale y col. 2002) que es procesado proteolíticamente en la mitocondria para producir una sub-unidad de 22 kDa que es capaz de formar una molécula multimérica de 24 sub-unidades que une hierro tan eficientemente como cFt (Langlois d'Estaintot y col. 2004).

La expresión de MtFt esta restringida a tejidos con actividad respiratoria elevada, y no a tejidos relacionados con el almacenaje de hierro, como ocurre con cFt. En humanos,

los ARNm y proteína de MtFt son detectados principalmente en testículos y cerebro (Levi y col. 2001). Se postula que la principal función asociada a esta proteína es el secuestro de un exceso de hierro, como lo realiza cFt. Esta función al interior de la mitocondria es de principal interés, ya que en estos organelos se realiza la síntesis de grupos hem y complejos Fe-S y por lo tanto están expuestos a un tráfico importante de hierro (Arosio y Levi, 2002; Lill y Kispal, 2000). Es posible que el hierro secuestrado en MtFt no esté disponible para participar en la reacción de Fenton, protegiendo a la mitocondria del daño oxidativo.

1.1.5 Acumulación de hierro en el cerebro

Las neuronas requieren de un adecuado suministro de hierro, debido a su elevado metabolismo y la síntesis de neurotransmisores (Beard y Connor, 2003). Pero, como se discutió anteriormente, el hierro es un productor intrínseco de ROS, es por esto que las células poseen mecanismos para evitar la acumulación de hierro por sobre los niveles necesarios. Sin embargo, en numerosas enfermedades neurodegenerativas la acumulación de hierro es un proceso región-específico que involucra la acumulación en áreas del cerebro que son blancos preferenciales en enfermedades neurodegenerativas, como el hipocampo y la *substantia nigra* (Connor y col., 1992; Götz y col, 2004).

El cerebro posee características que lo hacen un órgano único en lo que se refiere al metabolismo de hierro. Primero, se encuentra detrás de una barrera vascular, la cual limita el acceso del hierro presente en el plasma. El conocimiento sobre los mecanismos de entrega y de transporte de hierro en diversos tipos de células neuronales y glías es limitado. El conocimiento de estos mecanismos célula-específicos son cruciales en la comprensión

de porqué en muchas enfermedades neurodegenerativas ocurre una acumulación de este metal. Se han caracterizado dos mecanismos de transporte presentes en la barrera hematoencefálica (blood-brain barrier, BBB) que movilizan el hierro a través de las células endoteliales, uno por endocitosis mediado por TfR (Aisen, 1992) y otro mediado por transportadores aún no identificados del hierro no unido a Tf (Banks y col., 1988; Burdo y Connor, 2003). Luego de atravesar la BBB, gran parte del hierro se une rápidamente a la Tf presente en el cerebro (producida por oligodendrocitos y células del plexo coroideo) (Bartlett y col., 1991) para ser transportado y entregado a las células cerebrales.

Segundo, la concentración de hierro en varias regiones de cerebro varía enormemente. Regiones del cerebro que están asociadas con funciones motoras (regiones extrapiramidales) poseen mayor contenido de hierro que regiones no relacionadas (Koeppen, 1995), lo cual podría explicar porque los desordenes relacionados con movimientos son comúnmente asociados a un desbalance del contenido de hierro. Estas regiones contienen un bajo contenido de hierro en el nacimiento, sin embargo, a medida que envejecen estas regiones acumulan significantes cantidades del metal (Hallgren y Sourander, 1958; Zecca y col., 2001). Cuando individuos entre 60 a 90 años son comparados con individuos entre 28 a 49 años, una mayor cantidad de hierro y una mayor inmunoreactividad para cFt es observada en neuronas, microglías y astrocitos de la corteza, cerebelo, hipocampo, putamen, núcleo caudado, sustancia nigra, ganglio basal y amígdala (Connor y col., 1990). Estos resultados obtenidos desde tejidos post-mortem, también han sido confirmados a través de métodos no invasivos mediante Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) (Bartzokis y col., 1997; Martin y col., 1998, Ogg y col., 1999).

Existe importante evidencia que indica una relación entre la acumulación de hierro en el cerebro con la edad y el estrés oxidativo que podría causar un amplio rango de desordenes neurodegenerativos del sistema nervioso central, entre los que se cuentan las enfermedades de Parkinson (EP), Alzheimer (EA), Huntington (EH) (Moos y Morgan, 2004), Ataxia de Friedreich (FA) y anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, XLSA/A. Una acumulación celular de hierro guía a varias formas de modificaciones oxidativas reversibles e irreversibles de lípidos (derivados lipídicos de hidroperóxido), ADN (aductos y quiebres) y proteínas (carbonilación y modificaciones nitro) cuyo mal plegamiento y agregación guían a la formación de cuerpos de inclusión intracelulares, marcadores postmortem de muchas enfermedades neurodegenerativas (Alam y col., 1997a; Alam y col., 1997b; Dexter y col., 1994; Spencer y col., 1994). Como las expectativas de vida aumentan, es esperable observar un correspondiente aumento en la ocurrencia de desordenes neurodegenerativos relacionados con la acumulación de hierro.

El número de enfermedades neurológicas asociadas con una acumulación de hierro en el cerebro y la necesidad por aumentar el conocimiento de los mecanismos de la homeostasis de hierro en neuronas y glías estimulan el estudio de los mecanismos involucrados en el transporte y almacenamiento del hierro en el cerebro. Sin embargo, aún se desconoce los cambios de expresión de proteínas mitocondriales involucradas en el metabolismo del hierro, como MtFt, y la posible función que tendría esta proteína en respuesta a cambios en el contenido de hierro extracelular en células neuronales. Esto es de importancia, debido al desconocido papel que tendría MtFt en el metabolismo celular del hierro y la posible defensa concertada que tendría con cFt en contra de insultos oxidativos producidos por un aumento en el contenido de este metal en la célula a lo largo del tiempo.

La investigación de este Seminario de Título esta centrada en el posible papel de MtFt en la homeostasis celular de hierro en células neuronales expuestas a diferentes contenidos de hierro extracelular simulando un modelo de acumulación de hierro a lo largo del tiempo.

1.2 Hipótesis

La expresión de MtFt y de cFt en células neuronales responde diferencialmente a la oferta de hierro extracelular.

1.3 Objetivo general.

Caracterizar la expresión de MtFt y cFt en células neuronales expuestas a variadas concentraciones de hierro extracelular.

1.4 Objetivos Específicos

Objetivo 1: Determinar el efecto del hierro sobre los niveles de transcritos de MtFt y cFt.

Estudiar el efecto del hierro sobre la expresión de los ARNm de MtFt y cFt en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas por 12, 24 y 48 horas en presencia de concentraciones variadas de hierro en medio de cultivo.

Objetivo 2: Determinar el efecto del hierro sobre la expresión de las proteínas MtFt y cFt.

Estudiar el efecto del hierro sobre la expresión de las proteínas MtFt y cFt en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas por 12, 24 y 48 horas en presencia de concentraciones variadas de hierro en medio de cultivo.

Objetivo 3: Determinar la distribución subcelular del hierro incorporado.

Estudiar la distribución del hierro en las fracciones citosólicas y mitocondriales en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas por 24 horas con contenidos variados de hierro.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos Generales.

De Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) se obtuvo: N-N'-Methylenediacrylamine (110897); NaOH (106498); CaCl₂ x 2H₂O (160482); MgCl₂ (105833); KCl (104636); KH₂PO₄ (104873); NaCl (106404); Na₂HPO₄ x 2H₂O (106580); HCl (100317); EDTA (1118011); glicerol. De Invitrogen Life Sciences (California, USA), BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (10748-010). De Winkler LTDA (Santiago, Chile), acrilamida (BM-0070); Tris (BM-2000); glicina (BM-0820). De Sigma-Aldrich (USA), Ponceau S (P-3504); Tween 20 (P5627); Triton X-100 (T-6878); inhibidor de proteasas (P8340); DEPC (Dietil pirocarbonato) (D5758). De Calbiochem (EMD Chemicals Inc una empresa de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), medio de montaje FluorSave Reagent (345789). De AppliChem GMBH (USA), Caseína (A3275). De Polysciences Inc (Pennsylvania, USA), paraformaldehido (0380).

2.1.2 Cultivo Celular.

De Gibco-BRL, Life Technologies (Gaithersburg, USA), se obtuvieron: Minimal Essential Medium (MEM), medio de cultivo F-12 Nutrient Mixture, MEM aminoácidos no esenciales suero fetal bovino (FBS), mezcla de antibióticos/antimicóticos, Tripsina-5mM EDTA. De Laboratorios Sanderson (Santiago, Chile) se obtuvo agua de calidad inyectable.

2.1.3 Material Biológico.

La línea celular SH-SY5Y (American Type Culture Collection número CRL-2266, Rockville, MD) es un tercer sub-clon sucesivo de la línea SK-N-SH, la cual fue originalmente establecida de un cáncer de médula ósea humano (Encinas y col., 2000). La línea parental SK-N-SH compromete al menos dos fenotipos distintos morfológica y bioquímicamente: uno neuroblástico (tipo N) y otro substrato adherente (tipo S), quienes pueden experimentar trans-diferenciación. Al ser derivada de un sub-clon neuroblástico, esta línea celular retiene una pequeña proporción de células de tipo S (Encinas y col., 2000). Las células SH-SY5Y pueden ser morfológicamente diferenciadas a células de fenotipo neuronal mediante tratamiento con ácido retinoico (RA). El tratamiento con ácido retinoico inhibe la proliferación celular durante los primeros 8 a 10 días. Las células no tratadas continúan en mitosis y contienen cortos procesos de elongación. Las células diferenciadas exhiben un aumento en la expresión de la proteína asociada a microtúbulos MAP2, un marcador neuronal (Mastroeni y col., 2008). Las células tipo N se diferencian a un fenotipo neuronal creciendo en centros celulares con múltiples y finas proyecciones celulares (neuritas), mientras que las células tipo S no experimentan cambios morfológicos aparentes. Las células diferenciadas exhiben varias características de neuronas colinérgicas y dopaminérgicas, incluyendo la expresión de la enzima acetilcolina transferasa (ChAT) (Pahlman y col., 1995) y tirosina hidrosilasa (TH), de los transportadores VMAT, D₂R y D₃R y incorporación y liberación de DA (Presgraves y col., 2004; Mastroeni y col., 2008).

2.1.4 Anticuerpos y Western Blot

Anticuerpo cFtH: anticuerpo policlonal de cabra contra cFtH humana, Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA). Anticuerpo MtFt: suero policlonal de conejo cedido por Paolo Arosio (Levi y col., 2001). Anticuerpo Porina: anticuerpo policlonal de ratón contra Porina Humana, Abcam Inc. (Cambridge, USA). Anticuerpo Actina: anticuerpo policlonal de conejo en contra Actina humana (Sigma-Aldrich, USA). Anticuerpo contra IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, USA). Anticuerpo contra IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, USA).

2.1.5 Fluoróforos

De Molecular Probes (Invitrogen Life Sciences, California, USA): Anti IgG de ratón hecho en burro conjugado a Alexa-Fluor 488, Anti IgG de cabra hecho en burro conjugado a Alexa-Fluor 594.

2.1.6 Equipos.

Microscopio Confocal, Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Göttingen, Alemania); Lector de placas ELISA SUNRISE (Tecan Trading AG, Suiza); Cámaras electroforéticas (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA); Fuente de poder PS 4010-2 (Sigma-Aldrich); Centrifuga Mikro 22R (Hettich, Tuttlingen, Alemania).

2.2 METODOS

2.2.1 Cultivo Celular.

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y son incubadas bajo humedad a 37 °C y 5% CO₂ en medio MEM/F12 suplementado con 10% suero fetal de bovino (FBS), amino ácidos no esenciales MEM (Gibco, Invitrogen Cell Culture, USA), 10mM, 10 unidades/mL de Penicilina, 10 mg/mL de Estreptomicina, 250 ug/mL de Fungizona y buffer HEPES, 20 mM. La concentración total de hierro en el medio de cultivo es de 7,02 µM determinada por espectrometría de absorción atómica (Aguirre P y col., 2007). El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días.

2.2.2 Tratamientos de células SH-SY5Y con variadas concentraciones de hierro extracelular

Las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 en pocillos de 2cm², después de 8 días en cultivo las células alcanzan un estado de equilibrio en el número celular y una confluencia del 90 - 95%. En este momento, las células fueron tratadas por 4 días con 5 µM de ácido retinoico (RA) para luego ser expuestas a diferentes tratamientos con hierro por 12, 24 y 48 horas. Los tratamientos se realizaron aportando hierro adicional al medio de cultivo que contiene una concentración de 7 µM de hierro. El medio fue suplementado con 13 µM, 53 µM y 143 µM de Fe³⁺, utilizando el complejo de coordinación FeCl₃: nitrilotriacetato de sodio (Fe-NTA) en una proporción molar 1:2,2. Las concentraciones finales presentes en el medio de cultivo fueron de 20 µM, 60 µM y 150 µM. Para inducir la deficiencia de hierro se agregó el quelante de hierro desferroxamina

(DFO) en concentraciones de 2,5 μ M (Tapia y col., 1996; Hirsh y col., 2002). Este quelante reduce la concentración disponible de hierro en el medio de cultivo a 2 μ M y también reduce el contenido intracelular de hierro por ciclos de endocitosis-exocitosis (comunicación personal de Ioav Z. Cabantchik).

2.2.3 Expresión del ARNm de MtFt, cFtH en células SH-SY5Y expuestas a diferentes tratamientos con hierro extracelular.

Luego de los tratamientos con hierro por 24 y 48 horas se realizó la extracción de ARN desde las células SH-SY5Y utilizando TRIzol (Gibco, Invitrogen Cell Culture, USA) según instrucciones del fabricante. Las células fueron lisadas directamente agregando 1 ml de TRIzol a una placa de cultivo de 3.5 cm de diámetro, el lisado celular es homogenizado mediante el uso de una pipeta. El homogenizado fue incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 12.000 x g a 4 °C. Luego, la fase acuosa (superior) fue traspasada a un tubo limpio y el ARN presente en esta fase fue precipitado mediante la adición de 0,5 ml de isopropanol. Las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el sedimentado de ARN fue lavado una vez con etanol al 75 % en H₂O tratada con DEPC y centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. El ARN fue disuelto en H₂O tratada con DEPC y cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm, donde 1 unidad de absorbancia equivale a 40 μ g/ml de ARN.

La síntesis del ADNc se realizó mediante el uso de la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) RT (Reverse Transcriptase) (Invitrogen, 28025-013), usando como templado 2 µg de ARN total. En un tubo de micro centrifuga libre de nucleasa se agregaron 2 µg de ARN total, 1 µl de oligo dT(15) 500 µg/ml, 1 µl de Mix dNTP 10 mM (10 mM de cada uno de nucleótidos trifosfatos dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y 8 µl de agua libre de nucleasa. La mezcla fue calentada a 70 °C por 10 minutos y enfriada rápidamente a 4 °C. El contenido de los tubos fue colectado por centrifugación y se agregaron 4 µl de Buffer RT completo 5X (TrisHCl 250 mM, pH 8,3; KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µl DTT 0,1 M, 1 µl Inhibidor de Ribonucleasa (40 unidades/µl), 1 µl (200 unidades) de M-MLV RT. El contenido de los tubos fue mezclado e incubado por 50 minutos a 37 °C. La reacción es inactivada por calentamiento a 70 °C por 15 minutos.

El 10% (2 µl) del ADNc generado es usado como templado para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa. En un tubo de micro centrifuga libre de nucleasa se agregaron 2,5 µl de Buffer PCR 10X (Tris-HCl 200 mM / pH 8,4; KCl 500 mM), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de Mix dNTP 10 mM, 0,5 µl de partidor Forward de amplificación (10 µM), 0,5 µl de partidor Reverse de amplificación (10 µM), 0,2 µl de *Taq* Polimerasa (5 U/µl), 2 µl de ADNc y 18,05 µl de agua libre de nucleasa. Los partidores utilizados fueron MtFt (Forward) 5'TATTCCTTCACCAGTCCCGG3', MtFt (Reverse) 5'AGAGCGTGCAATTCCAGCAAC3' los cuales generaron un fragmento de 204 pares de bases (bp). cFtH (Forward) 5'GCGATGATGTGGCTTTGAAG3', cFtH (Reverse) 5'TGGCTTTCACCTGCTCATTC3' los que generan un fragmento de 309 bp. Actina (Forward) 5'CGCTGCGCTGGTCGTCGACA3' Actina (Reverse) 5'GTCACGCACGATTTCCCGCT3', los cuales generaron un fragmento de 495 bp. El

programa de ciclos para MtFt fue el siguiente: 5 minutos a 95 °C, 38 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 60 segundos a 58 °C y 40 segundos a 72 °C, seguido por una amplificación final de 10 minutos a 72 °C. El programa de ciclos para cFtH fue el siguiente: 5 minutos a 95 °C, 31 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 60 segundos a 50 °C y 40 segundos a 72 °C, seguido por una amplificación final de 10 minutos a 72 °C. Para los procesos de amplificación de MtFt y cFtH se utilizó como control interno de amplificación el fragmento de actina. Actina y MtFt o cFtH son amplificados conjuntamente, no observando competencia entre estos debido a que la amplificación genera fragmentos de pequeño tamaño.

2.2.4 Aislamiento de mitocondrias

Para la determinación de la proteína de MtFt a través de Western Blot, fue necesario realizar el aislamiento de mitocondrias. Las mitocondrias pueden ser fácilmente aisladas desde células de mamíferos por un simple método de homogenización, conformado por una centrifugación a baja velocidad (600 x g) para la eliminación de núcleo, membranas y células no dañadas, seguido por una centrifugación a alta velocidad (11.000 x g) para la separación de la fracción citosólica y mitocondrial. El sedimentado final representa una fracción cruda de mitocondrias.

Las células SH-SY5Y fueron crecidas hasta un 80-90% de confluencia (15×10^6 células), diferenciadas por 4 días con ácido retinoico y expuestas por 12, 24 y 48 horas a concentraciones de hierro en el medio de cultivo de 2 μM , 7 μM (control), 60 μM y 150 μM . Las células fueron disgregadas desde la placa de cultivo con Tris-salino EDTA mediante una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron colectadas por

centrifugación a 600 x g por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue descartado. El sedimentado de células fue resuspendido en 10 volúmenes (1,5 ml) de Buffer de Extracción 1X (HEPES 10 mM / pH 7,5; manitol 200 mM, Sacarosa 70 mM y EGTA 1 mM más un cóctel de inhibidor de proteasas (leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, pepstatina A 0,7 µg/ml) (100:1[v/v])) e incubado por 15 minutos en hielo. Las células fueron homogenizadas con 30 golpes utilizando un homogenizador Dounce (Sigma, P7734). El homogenizado fue centrifugado a 600 x g por 10 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, el líquido sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y centrifugado a 11.000 x g por 10 minutos a 4 °C. El sedimentado es considerado como la fracción mitocondrial y el sobrenadante acuoso, como la fracción citosólica. El sedimentado mitocondrial es resuspendido en un buffer de almacenamiento 1X (HEPES 10mM / pH 7,5, Sacarosa 250 mM, ATP 1 mM, ADP 80 mM, Succinato de Sodio 5 mM, K₂HPO₄ 2 mM y DTT 1mM) y almacenado junto a la fracción citosólica a -20°C, para posteriores ensayos.

2.2.5 Western Blots del extracto celular y la fracción mitocondrial.

Para preparar los extractos celulares, las células SH-SY5Y expuestas a diferentes tratamientos con hierro se disgregaron desde la placa de cultivo con Tris-salino EDTA mediante una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron colectadas por centrifugación a 600 x g por 5 minutos. El sobrenadante fue removido y las células o la fracción mitocondrial son resuspendidos en buffer de lisis (50 µl/1x10⁶ células) conformado por una solución tampón de lisis (NP-40 0,5%, HEPES10 mM / pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, KCl 40 mM, PMSF 1 mM, Glicerol 5%, DTT 1 mM) más un cóctel de inhibidor de proteasas (leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, pepstatina A 0,7 µg/ml) (100:1[v/v]),

e incubadas por 15 minutos en hielo. El homogenizado fue centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, para quedarse con el sobrenadante. Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (BCA) (Protein Methods).

Para la separación electroforética, se cargaron 30 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 12,5 % en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1,5 hora a 300 mA y 4 °C. Luego de la electrotransferencia, la membrana fue teñida con Ponceau-S para ver si el proceso de transferencia fue exitoso, luego la membrana fue lavada con TBS-T20 (Tris-HCl pH 7, NaCl 150 mM y Tween-20 0,2%) para eliminar el Ponceau-S. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave con leche descremada 5% en solución TBS-T20. La incubación con el anticuerpo primario contra las proteínas cFtH, MtFt, porina y actina se realizó durante toda la noche a 4 °C y agitación suave. Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-T20 para eliminar el anticuerpo primario unido inespecíficamente a la membrana. A continuación se incubó durante 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón o anti IgG de conejo conjugado con peroxidada de rábano en leche descremada 0,5% en solución TBS-T20. Se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con TBS-T20, para luego revelar usando el kit quimioluminiscente y autoradiografía (Pierce, 34080). La señal quimioluminiscente se detectó mediante placas fotográficas (Fuji).

2.2.6. Determinación inmunocitoquímica de ferritina mitocondrial en células de cultivo.

Luego de los tratamientos con hierro, las células fueron lavadas con PBS y fijadas por 10 minutos con la solución de paraformaldehído (PFA) 4% y sacarosa 4% en PBS. Luego fueron permeabilizadas por 5 minutos con Triton X-100 0,1% en PBS. Las células fueron doblemente teñidas usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína TH (tiroxina hidroxilasa) (1:1000), utilizada como marcador de neuronas dopaminérgicas, y suero policlonal de conejo contra MtFt (1:500) durante toda la noche a 4 °C. Luego de esto, las células fueron lavadas e incubadas por 1 hora con una mezcla de anticuerpo anti IgG de ratón hecho en burro conjugado con Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes 1:400) junto con un anticuerpo anti IgG de conejo hecho en burro conjugado con Alexa-Fluor 568 (Molecular Probes 1:400). Los cubreobjetos fueron montados en un portaobjeto con medio de montaje FluorSave Reagent (Calbiochem).

Las preparaciones fueron observadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 con la configuración multitrack que permite la excitación con dos longitudes de onda diferentes (Exc = 543 nm Filtro 560 nm) para CY y (Exc = 488 nm Filtro 505-530 nm) para FITC.

2.2.7 Medio de cultivo MEM-F12 10% FBS bajo en hierro y distribución subcelular de la incorporación de hierro al equilibrio utilizando el isótopo ^{55}Fe .

Las células luego de ser crecidas en medio MEM-F12 / 10 % FBS y diferenciadas por 4 días con RA, fueron expuestas por 24 horas al medio MEM-F12 10% de FBS bajo en hierro. Este medio se preparó tratando 20 ml de FBS con 5 g de Chelex 100 (resina de intercambio iónico que quela preferentemente metales divalentes de transición, Bio-Rad) por 72 horas. Este tratamiento disminuyó la concentración de hierro en el FBS de $65\ \mu\text{M}$ a $1,0\ \mu\text{M}$. El FBS bajo en hierro fue suplementado con CuCl_2 $1,5\ \mu\text{M}$, ZnCl_2 $30\ \mu\text{M}$ y MnCl_2 $15\ \text{nM}$, debido a que estos metales también son quelados. La determinación de la concentración del hierro presente en el FBS fue realizada mediante el ensayo de 2,2'-bipiridilo (Drysdale y Ramsay, 1965; Hill, 1931), el que brevemente consiste en: $160\ \mu\text{l}$ de FBS bajo en hierro fue tratado por 1 hora a $100\ ^\circ\text{C}$ con $20\ \mu\text{l}$ de 2,2'-bipiridilo (0,5% en Acido Acético 60%) y $20\ \mu\text{l}$ de Na_2SO_3 (0,75M). La determinación se basa en la coloración roja del complejo formado por el Fe^{2+} presente en el medio y el 2,2'-bipiridilo, este complejo es medido a 520nm . El Na_2SO_3 permite la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} .

La incorporación celular de hierro se midió en células expuestas por 24 horas a una solución del isótopo radioactivo ^{55}Fe , de concentración y actividad específica conocida. El isótopo radioactivo ($81.1\ \text{mCi/mg}$) se combinó con NTA en una relación 1:2,2 (mol:mol), a esta mezcla se le denominó $^{55}\text{Fe-NTA}$. $0,5\ \mu\text{M}$ de $^{55}\text{Fe-NTA}$ es agregado al medio de cultivo MEM-F12 10% FBS bajo en hierro. Para obtener medios de cultivo celular con diferentes concentraciones de hierro, al MEM-F12 10% FBS bajo en hierro se adicionó hierro no radioactivo en la forma de Fe-NTA (1:2,2) obteniendo concentraciones finales de

hierro de 2, 7, 20, 60 y 150 μM . Cumplidas las 24 horas de tratamiento, se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS. Las células se disgregaron con Tris-Salino EDTA. Se procedió a realizar el aislamiento de las fracciones citosólicas y mitocondriales mediante el protocolo descrito en 2.2.4. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Ácido Bicinónico de las fracciones y la radioactividad de ^{55}Fe en un contador de radioactividad beta de las células completas, fracción citosólica y mitocondrial.

3. RESULTADOS

3.1 El contenido de hierro en el medio extracelular regula los niveles de la proteína y no del ARNm de cFtH

Ferritina es considerada como la principal proteína de almacenaje de hierro en mamíferos y como la primera línea de defensa en contra de la sobrecarga de hierro. Debido a que cFtH es el principal regulador de la actividad de ferritina, y que ferritinas enriquecidas en cFtH están asociadas a condiciones de respuestas a estrés y que en neuronas este tipo de ferritinas está presente, procedimos a estudiar los niveles de ARNm y de proteína de esta sub-unidad.

No se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de cFtH en células expuestas por 24 horas y 48 horas de tratamiento hierro 2 μM (DFO), Control (7 μM), 20 μM , 60 μM y 150 μM (Figura 4). Este resultado es consistente con trabajos previos que demuestran que la principal regulación de las sub-unidades de ferritina citosólica mediado por hierro es a nivel post-transcripcional.

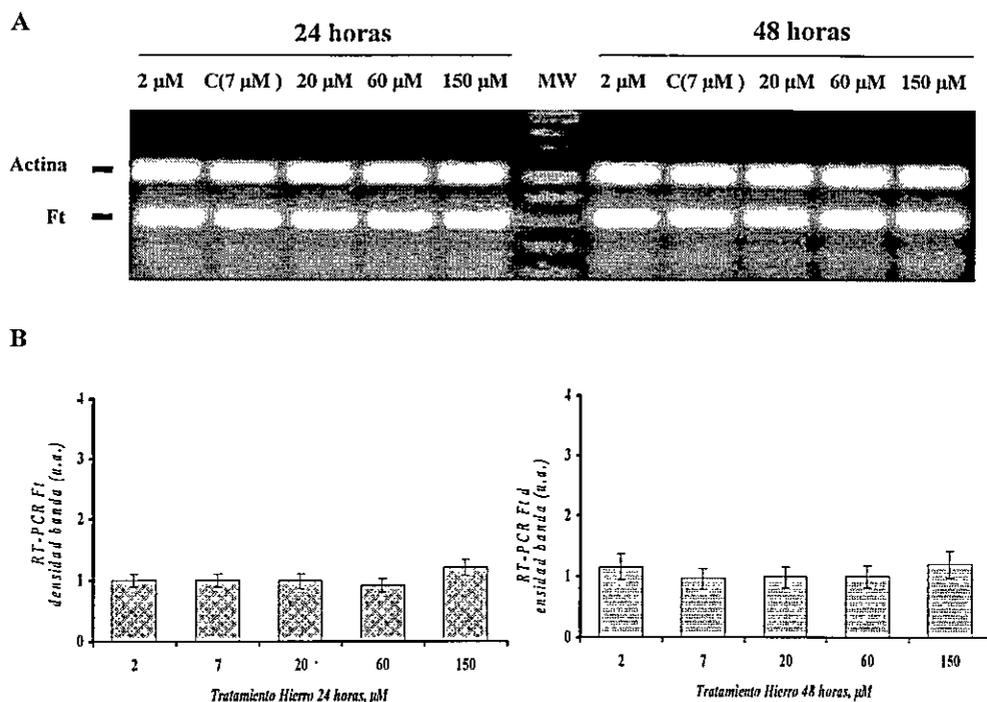


Figura 4 | El hierro no induce cambios en la expresión del ARNm de cFt. A) Análisis de expresión de cFt mediante RT-PCR de células SH-SY5Y diferenciadas y expuestas por 24 horas y 48 horas a concentraciones de hierro extracelular de 2 μ M, 7 μ M C (7 μ M), 60 μ M y 150 μ M. MW, Marcador de Peso B) Cuantificación de la expresión de cFt de los distintos tratamientos señalados normalizados con respecto a los niveles de densidad de banda de la condición control C (7 μ M). Los datos representan el promedio \pm SEM. n=3. No se observan diferencias significativas, $p > 0.05$, determinado por test ANOVA.

Debido a que no existieron cambios en los niveles de ARNm de cFtH en células expuestas a diferentes tratamientos de hierro y que la modificación de los niveles de las sub-unidades de la cFt reportadas en otras investigaciones se deben principalmente a un mecanismo de regulación post-transcripcional, esperamos observar una modificación de los niveles de la proteína cFtH en células expuestas por 24 horas y 48 horas a diferentes tratamientos con hierro (Figura 5). A 2 μ M de hierro se produjo una disminución de 0,25 veces en los niveles de cFtH a las 24 horas de tratamiento comparado a los niveles de células control expuestas a 7 μ M, resultado consistente con un menor contenido de hierro celular que genera un menor requerimiento de la proteína de almacenaje de este metal. A

las 24 horas de tratamiento se produjo un aumento de 3 veces en los niveles de la proteína de cFtH a 20 μM , de 1,4 veces a 60 μM y de 3,5 veces a 100 μM , debido a un posible aumento en los niveles celulares de hierro. A 150 μM se produjo un aumento de 6,2 veces en los niveles de la proteína de cFtH a las 24 horas de tratamiento. La disminución observada a las 24 horas a tratamiento de 2 μM no es observada luego de 48 horas. A las 48 horas de tratamiento en condiciones de sobrecarga de hierro (60 μM , 100 μM y 150 μM) se observa una disminución en los niveles de proteína, lo que podría ser explicado por: i) una mayor saturación de la ferritina, permitiendo una disminución del LIP citosólico lo que produciría un menor requerimiento de la proteína a tratamientos prolongados con hierro y/o ii) por una disminución en los niveles de hierro celulares dado por un eflujo de hierro desde las células expuestas a condiciones de sobrecarga de hierro. Este eflujo de hierro es mediado por un aumento en el transportador de salida de hierro, Ireg1. Este aumento fue anteriormente reportado por nuestro laboratorio y que en conjunto reflejan un mecanismo celular adaptativo a condiciones de sobrecarga de hierro (Aguirre y col., 2005).

mitocondria (Napier y col., 2005). MtFt es una proteína mitocondrial de la cual se desconocen los mecanismos de regulación transcripcional y/o post-transcripcional y debido a su capacidad de almacenar hierro en la mitocondria, su regulación y función son esenciales para comprender el metabolismo celular y mitocondrial de este metal.

3.2.1 Aumento de la expresión del ARNm de MtFt en condiciones de deficiencia y sobrecarga de hierro.

Considerando como antecedente el resultado encontrado en las células SH-SY5Y expuestas por 24 y 48 horas a diferentes concentraciones de hierro extracelular y en el que no se observaron cambios en los niveles del ARNm de cFtH, y que los cambios observados en los niveles de proteínas se determinan por un mecanismo post-transcripcional, evaluamos si existía una respuesta diferencial del ARNm de MtFt asociado a una posible regulación transcripcional mediada por los niveles de hierro. La Figura 6 muestra el resultado de un RT-PCR representativo para el ARNm de células SH-SY5Y expuestas por 24 horas a distintos tratamientos de hierro en el medio de cultivo. A diferencia a lo observado en la cFtH, se observaron diferencias en los niveles de ARNm de MtFt. A 150 μ M de hierro en el medio de cultivo se produjo un aumento de 1.8 veces en los niveles de ARNm comparado a los niveles de células control expuestas a 7 μ M. Interesantemente, a 60 μ M se produjo una disminución de 0.7 veces en los niveles de ARNm. Un resultado inesperado fue el aumento de 1.1 veces en los niveles de ARNm en condiciones de deficiencia de hierro mediante el uso de DFO en el medio de cultivo. Estos resultados indicarían una posible regulación de la expresión de MtFt a nivel transcripcional y las

señales que la regulan permitirían un aumento en los niveles de ARNm en condiciones de deficiencia y de sobrecarga de hierro.

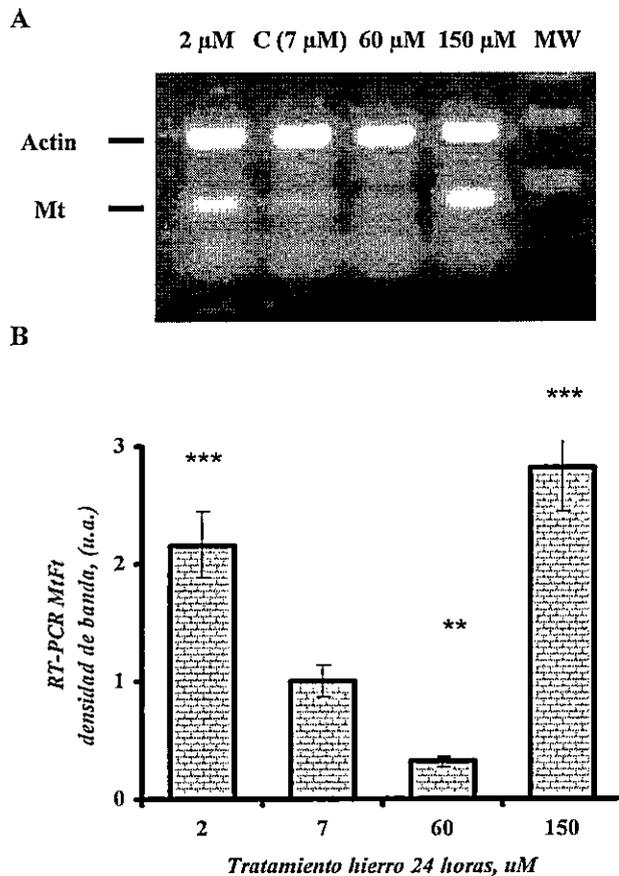


Figura 6 | El hierro induce la expresión del ARNm de MtFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga con este metal. A) Análisis de expresión de MtFt mediante RT-PCR de células SH-SY5Y diferenciadas y expuestas por 24 horas a concentraciones de hierro extracelular de 2 μ M, 7 μ M C (7 μ M), 60 μ M y 150 μ M. B) Cuantificación de la expresión de MtFt de los distintos tratamientos señalados normalizados con respecto a los niveles de la densidad de banda de la condición control. Los datos representan el promedio \pm SEM. n=3. ***, p < 0,001; **, p < 0,01 determinado por test ANOVA.

3.2.2 Aumento en los niveles de proteína de MtFt en condiciones de deficiencia y sobrecarga de hierro.

En base a los resultados que demuestran que el hierro induce la expresión del ARNm de MtFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga de este metal, se analizó los niveles de la proteína MtFt de células expuestas por 12, 24 y 48 horas a diferentes concentraciones de hierro extracelular (Figura 7). Se encontró un aumento a las 12 horas y

24 horas en los niveles de la proteína tanto en condiciones de deficiencia como de sobrecarga de hierro. A las 12 horas de tratamiento con 2 μM de hierro, se produjo un aumento de 2,5 veces en los niveles de MtFt y a las 24 horas se produjo un aumento de 0,7 veces. Los niveles de MtFt a 150 μM de hierro, aumentaron 8,8 veces a las 12 horas de tratamiento y de 1 vez a las 24 horas. Este resultado es consistente con lo reportado anteriormente que postula que la principal función de esta proteína es el secuestro del exceso de hierro presente en la mitocondria, protegiendo a este organelo del daño oxidativo mediado por el metal (Cazzola y col., 2003; Campanella y col., 2004). A 60 μM se produjo un aumento de 3,8 veces y de 1,3 veces en los niveles de proteína de MtFt a las 12 horas y 24 horas de tratamiento, respectivamente. Esto se contradice con el resultado obtenido en los niveles de ARNm en donde a las 24 horas se observa una disminución en comparación a la situación control. Estos aumentos en los niveles de la proteína a 2 μM , 60 μM y 150 μM son dependientes del tiempo de exposición, no observando diferencias significativas a las 48 horas de tratamiento en los niveles de proteína a 2 μM en comparación a la condición control 7 μM . A las 48 horas de tratamiento con 60 μM y 150 μM se produce una disminución de 0,6 veces respecto a control en los niveles de proteína de MtFt.

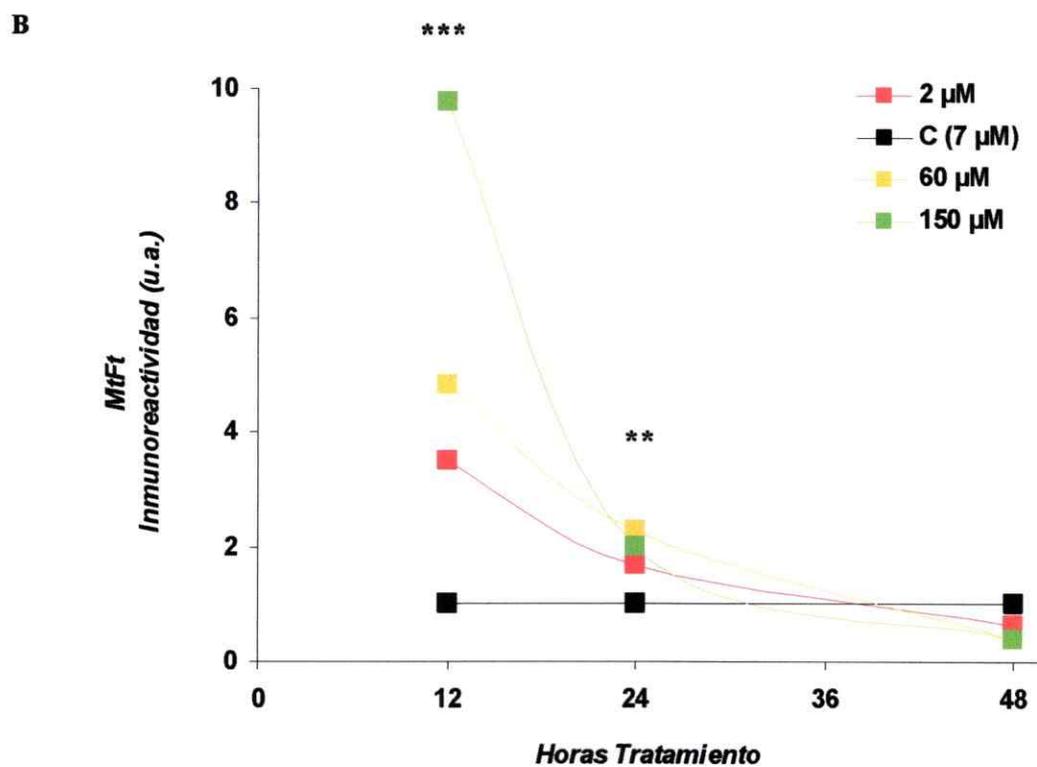
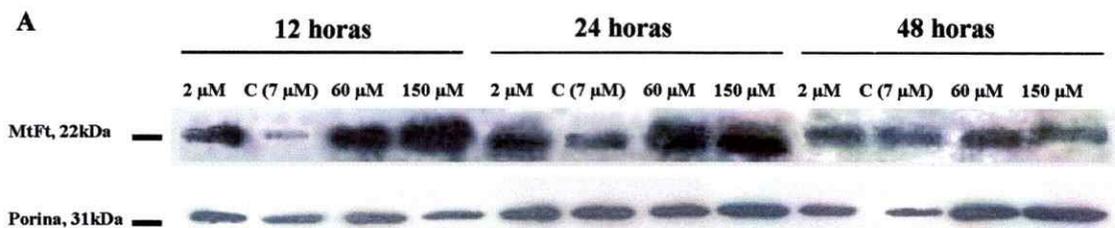


Figura 7 | El hierro induce la expresión de la proteína MtFt en condiciones de deficiencia y de sobrecarga con este metal. A) Western Blot representativo de los cambios en la inmunoreactividad para MtFt presente en las fracciones mitocondriales de células SH-SY5Y diferenciadas expuestas por 12, 24 y 48 horas a concentraciones de hierro extracelular de 2 μ M, 7 μ M C (7 μ M), 60 μ M y 150 μ M. Como control de carga de la fracción mitocondrial se utilizo la proteína porina presente en la membrana mitocondrial externa, se detecta una banda de aproximadamente 31 kDa. B) Cuantificación de la inmunoreactividad de MtFt normalizada con respecto a los niveles de la condición Control C(7 μ M) a los distintos tratamientos señalados. Los datos representan el promedio \pm SEM. n=3. ***, p < 0,001; **, p < 0,01. A las 48 horas no se observan diferencias significativas, p > 0.05, determinado por test de ANOVA.

3.3 Determinación inmunocitoquímica de MtFt

La presencia de MtFt en células SH-SY5Y fue documentada por inmunocitoquímica en condiciones de deficiencia y sobrecarga de hierro a 12 horas (Figura 8), 24 horas (Figura 9) y 48 horas de tratamiento con hierro (Figura 10). Los resultados indicarían un posible aumento en los niveles de la proteína MtFt en células expuestas por 12 y 24 horas de tratamiento. Esos resultados se correlacionarían a los obtenidos mediante Western Blot en donde MtFt experimenta un aumento en los niveles de proteína en condiciones de deficiencia y de sobrecarga de hierro, estos aumentos fueron dependientes del tiempo de exposición.

En las Figuras 8, 9 y 10 se muestran campos representativos de células expuestas a diferentes tratamientos. A partir de las células expuestas a la situación control por 12, 24 y 48 horas se establecieron los parámetros basales para determinar las diferencias con las células expuestas a los tratamientos diferentes al control. Nivel de laser 543nm 80%, 488nm 3%, pinhole 280 μm , Scan Zoom 2.7, Filtros LP560, BP 505-530, Objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil.

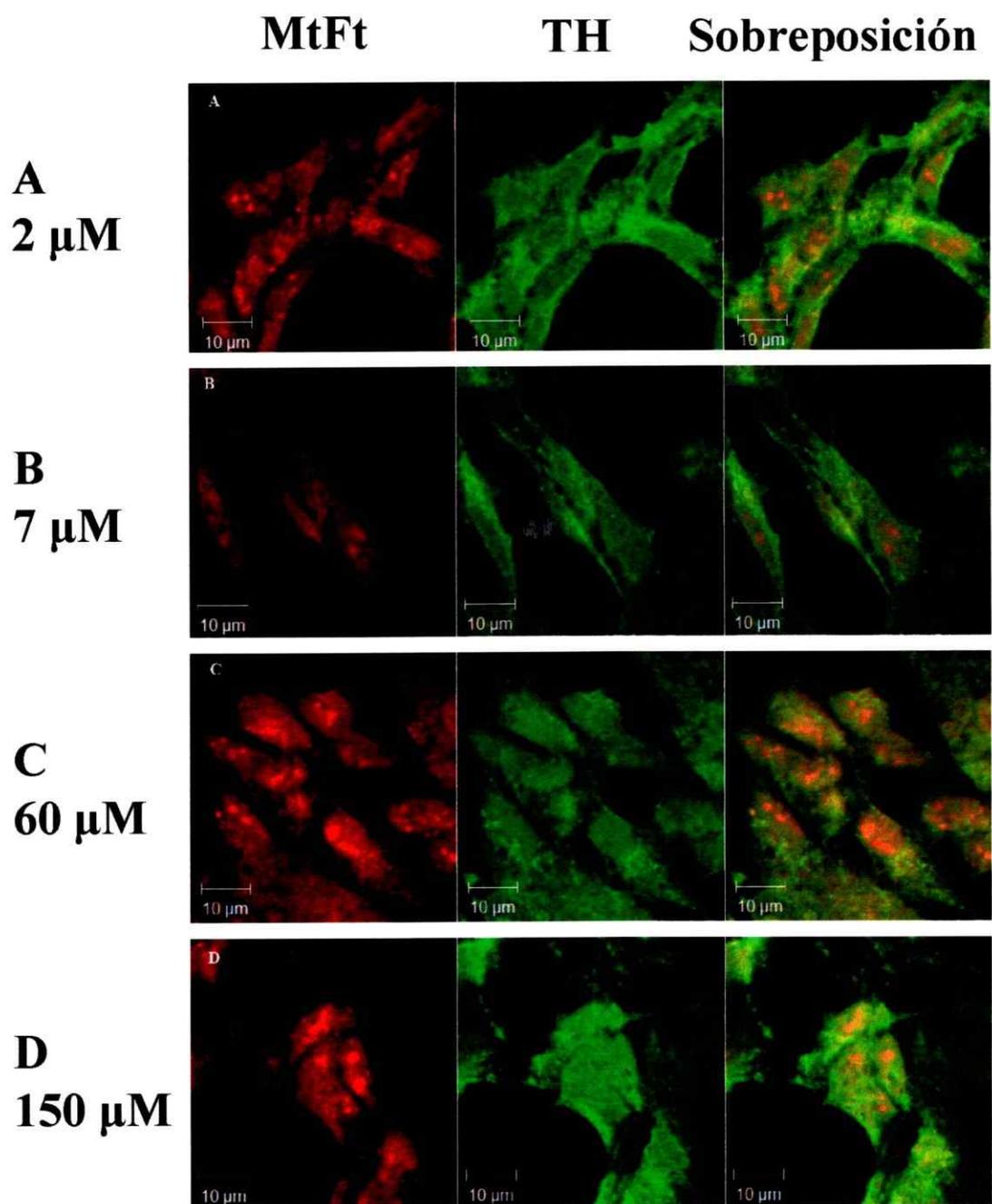


Figura 8 | La deficiencia y la sobrecarga de hierro inducen un aumento en la expresión de MtFt en células SH-SY5Y expuestas por 12 horas de tratamiento. A-D: inmunofluorescencia de células SH-SY5Y cultivadas por 12 horas con 2 μ M, 7 μ M, 60 μ M y 150 μ M de hierro. Las células fueron posteriormente teñidas usando suero de conejo en contra MtFt (rojo) y anticuerpo contra Tiroxina Hidroxilasa (TH, verde), un marcador de neuronas dopaminérgicas. Se observan campos representativos.

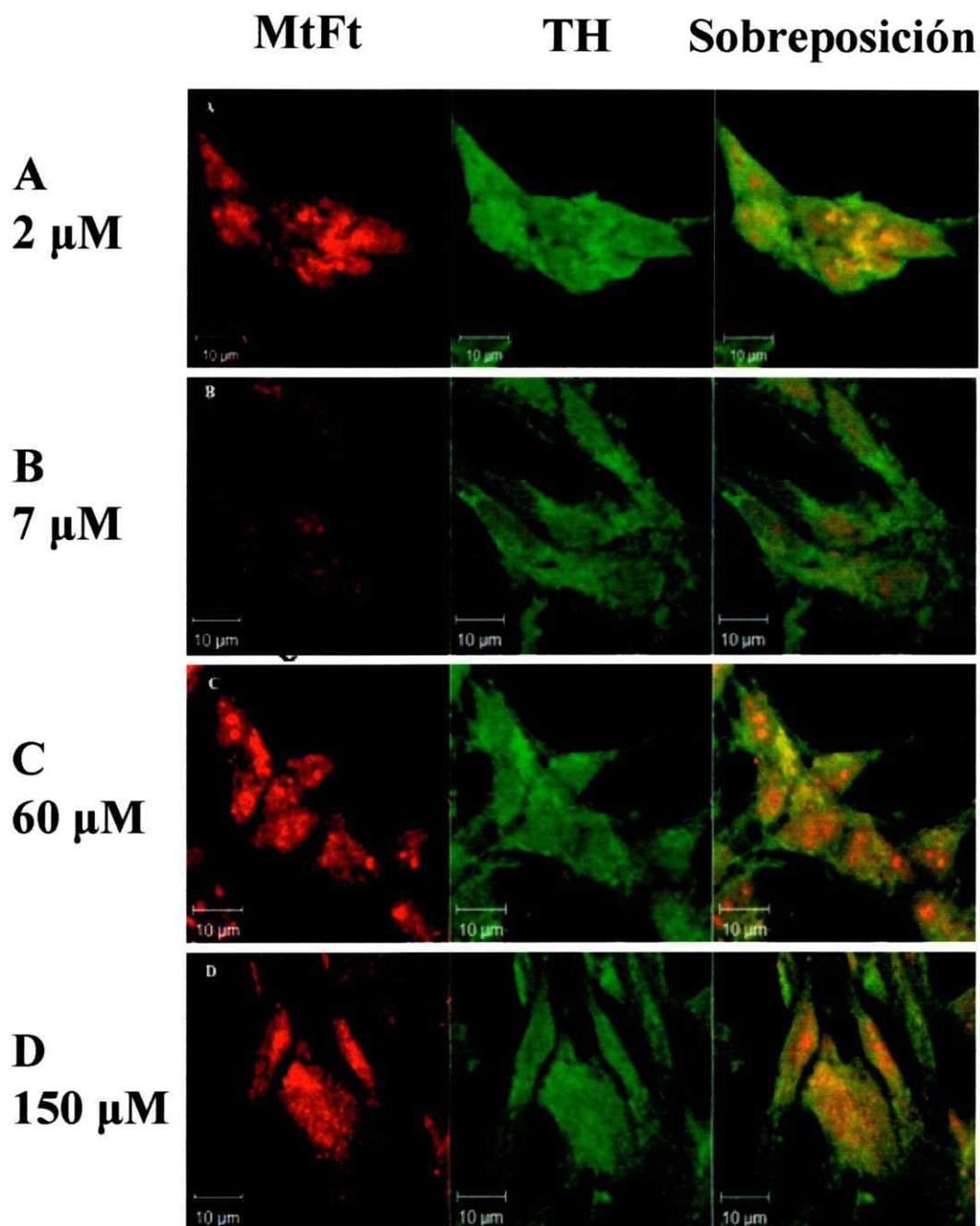


Figura 9 | La deficiencia y la sobrecarga de hierro inducen un aumento en la expresión de MtFt en células SH-SY5Y expuestas por 24 horas de tratamiento. A-D: inmunofluorescencia de células SH-SY5Y cultivadas por 24 horas con 2 μ M, 7 μ M, 60 μ M y 150 μ M de hierro. Las células fueron posteriormente teñidas usando suero de conejo en contra MtFt (rojo) y anticuerpo contra Tiroxina Hidroxilasa (TH, verde), un marcador de neuronas dopaminérgicas. Se observan campos representativos.

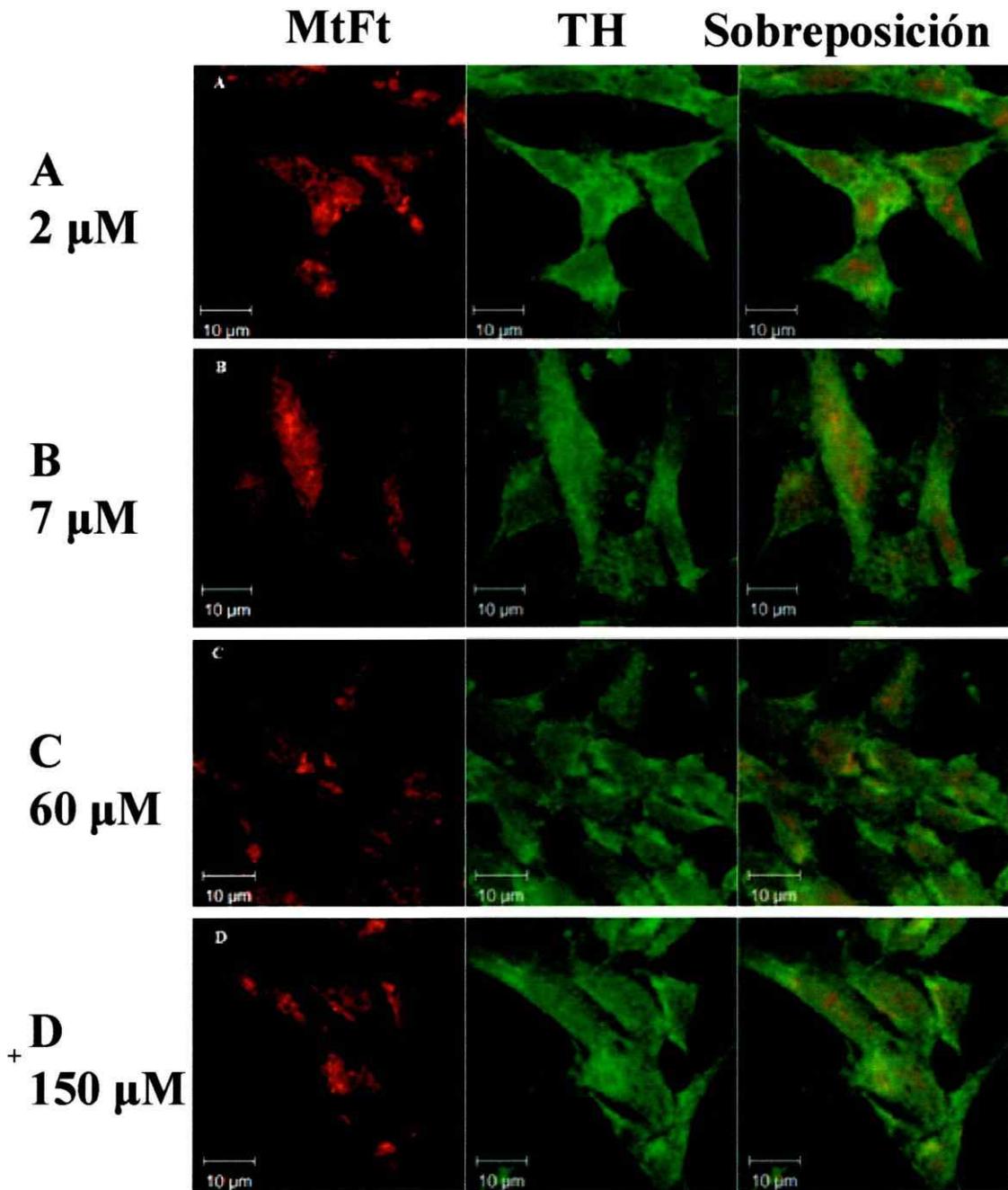


Figura 10 | El hierro no induce un aumento en la expresión de MtFt en condiciones prolongadas de tratamiento en células SH-SY5Y. A-D: inmunofluorescencia de células SH-SY5Y cultivadas por 48 horas con 2 μ M, 7 μ M, 60 μ M y 150 μ M de hierro. Las células fueron posteriormente teñidas usando suero de conejo en contra MtFt (rojo) y anticuerpo contra Tiroxina Hidroxilasa (TH, verde), un marcador de neuronas dopaminérgicas. Se observan campos representativos.

3.4 Distribución subcelular de la incorporación de hierro al equilibrio utilizando el isótopo ^{55}Fe

Finalmente, se determinó el efecto que genera un aumento en la oferta de hierro extracelular en la distribución celular del hierro acumulado. Según el método empleado para la separación de fracciones sub-celulares, el contenido de hierro del precipitado de la centrifugación a 11.000 x g corresponde esencialmente al hierro contenido en la mitocondria, el que probablemente este formando parte de MtFt, de proteínas mitocondriales, de complejos Fe-S o grupos Hem y del LIP mitocondrial. La fracción del sobrenadante se asocia al hierro soluble citosólico, que forma parte de cFt, de proteínas citosólicas con complejos Fe-S o grupos Hem o del LIP citosólico. Las células fueron expuestas por 24 horas a concentraciones de hierro extracelular de 2 μM , 7 μM (control), 20 μM y de sobrecargas de 60 μM y 150 μM (Figura 11).

En condiciones de sobrecarga, el contenido del hierro incorporado en célula total aumentó paralelamente al aumento del contenido de hierro en el medio de cultivo, esto sería explicado por la persistencia del transportador de entrada de hierro, DMT1, a elevadas concentraciones de hierro produciendo una continua incorporación del metal (Núñez y col., 2004). En condiciones de deficiencia, se observa un aumento en la incorporación de hierro en comparación con la situación control, lo que sería explicado por un aumento en la necesidad del metal y un aumento del transportador DMT1 (no mostrado) (Figura 11A).

En condiciones de deficiencia, se observa un aumento del contenido de hierro en ambas fracciones (citosólica y mitocondrial), sin embargo la incorporación del metal fue

mayor en la fracción mitocondrial resultado que indicaría que en esta condición, el hierro es destinado preferentemente hacia la mitocondria. En la condición control y en el tratamiento 20 μM no se observan diferencias significativas entre el contenido del hierro citosólico y mitocondrial, indicando que en ambos compartimentos existe una distribución similar del hierro incorporado en la célula.

En células expuestas a 60 μM se observa un leve aumento en el contenido de hierro citosólico, sin un cambio aparente en los niveles de hierro mitocondriales. Estos resultados indicarían una posible mantención de los niveles del hierro mitocondriales en células expuestas a este tratamiento, por lo que el exceso de hierro incorporado en la célula total es almacenado principalmente en el citosol. En células expuestas a 150 μM se observó un aumento significativo en el contenido de hierro citosólico y mitocondrial, sin embargo los resultados indican que el hierro celular en exceso es dirigido principalmente hacia la mitocondria. Esto indicaría la existencia de un sistema de regulación de los niveles celulares del hierro y en el que la mitocondria tendría un papel central como moderador de los niveles citosólicos de este metal en condiciones de exceso. Debido al potencial daño oxidativo que puede causar la presencia de hierro en exceso en la mitocondria, es muy posible que este hierro sea secuestrado en MtFt y que no sea potencialmente tóxico para participar en la reacción de Fenton, protegiendo a la mitocondria y a la célula del daño oxidativo. Además, esto podría indicar una mayor capacidad de MtFt para captar y proteger del exceso de hierro que cFt en células neuronales.

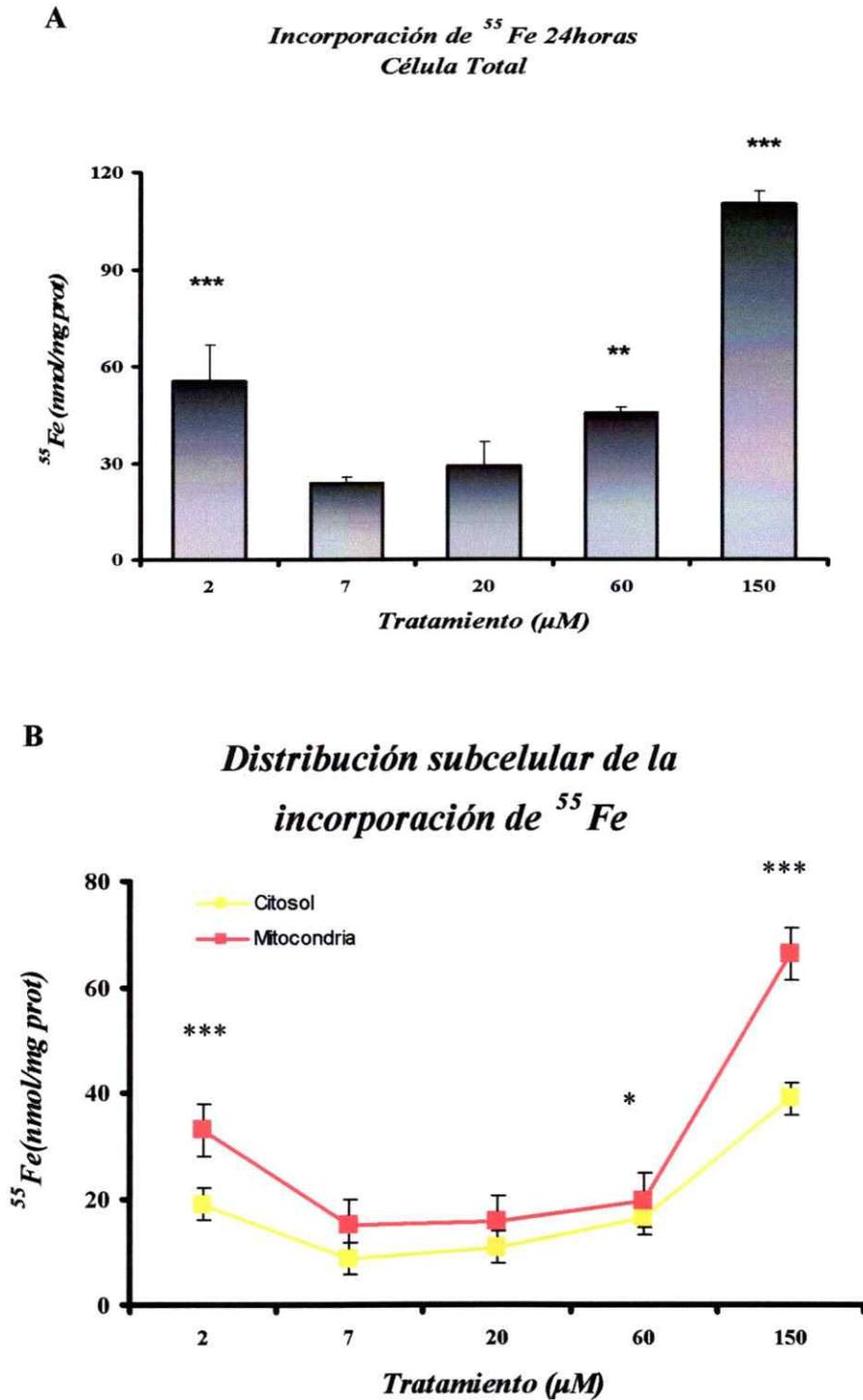


Figura 11 | Incorporación y distribución subcelular de ^{55}Fe en células SH-SY5Y. Las células fueron expuestas a medio de cultivo con concentraciones de hierro de 2 μM , 7 μM , 20 μM , 60 μM y 150 μM adicionados con ^{55}Fe -NTA. Después de 24 horas se determinó la radioactividad de célula completa (A), fracción citosólica y mitocondrial (B). El sobrenadante de 11.000 x g se considera como la fracción citosólica, y el sedimentado, la fracción mitocondrial. Los datos representan el promedio \pm SEM. n=3. ***, p < 0.001; **, p < 0.01; *, p < 0.05; ns, no significativo determinados por test ANOVA.

4. DISCUSION

El hierro y el oxígeno son elementos centrales para la vida en la tierra. La química entre el hierro acuoso y oxígeno molecular podría producir iones ferricos, el que es un trillón de veces menos soluble que las concentraciones de hierro presente en las células. En el ambiente fisiológico, solamente una proteína, ferritina esta involucrada en concentrar el hierro a los niveles necesarios para el metabolismo aeróbico. La formación y la disolución de un centro mineral de hierro es la principal función de ferritina, la cual adicionalmente detoxifica el exceso de hierro. El reciente descubrimiento de una nueva proteína mitocondrial involucrada en el almacenamiento de hierro apoya la teoría que sostiene que la mitocondria es un compartimiento con un metabolismo de hierro propio, pero a pesar de estos nuevos datos, las vías de tráfico del hierro hacia este organelo aún son poco claras. Los resultados presentados en esta memoria de título indican que MtFt posee un rol esencial en el metabolismo del hierro celular en células neuronales y sus posibles funciones serían: i) asegurar un suministro adecuado de hierro hacia la mitocondria en condiciones de deficiencia de este metal, de esta forma se produciría una síntesis adecuado de los complejos Fe-S y grupos Hem necesarios para la funcionalidad de proteínas celulares esenciales; ii) proteger a la mitocondria de los daños oxidativos causados por una sobrecarga de hierro. Bajos condiciones de sobrecarga de hierro cFt, al igual que MtFt, aumenta su expresión, generando una respuesta concertada de protección celular.

4.1 Rol de Ferritina Citosólica en células neuronales expuestas a diferentes tratamientos de hierro extracelular.

El sistema de regulación de la expresión de cFt mejor caracterizado es post-transcripcional, IRE-IRP. Este sistema no solamente es sensible a la disponibilidad de hierro, sino también al estado oxidativo de la célula y regula de manera similar los niveles de cFtH y cFtL. En muchos aspectos, ferritina puede ser considerada como miembro de un grupo de proteínas que responden a estrés e inflamación. Citoquinas inflamatorias, particularmente el factor de necrosis tumoral del tipo α (TNF α) e interleukina-2 (IL-2), aumentan la síntesis de ferritina en varios tipos celulares de mamíferos (Miller y col., 1991; Orino y col., 2001). Otros mecanismos post-transcripcionales diferentes a los relacionados con la interacción IRE-IRP han sido descritos en células HepG2 en donde el aumento de la expresión de ferritina por IL-2 β ocurre sin la modificación de los niveles de ARNm de cFtH y cFtL, estos efectos son mediados por una proteína de unión a regiones ricas en guanosina-citidina (GC) (Arosio y Levi, 2002). Muchos de los estímulos relacionados con una sobrecarga de hierro, la respuesta inflamatoria y el consecuente aumento en los niveles de cFt parecen aumentar los niveles de cFtH preferencialmente por sobre cFtL, esto determina un aumento en los sitios catalíticos, y una reducción de la biodisponibilidad del hierro.

Ft(H) es el principal regulador de la actividad de ferritina, y una sobre-expresión de esta modifica el metabolismo celular del hierro. Esto ha sido demostrado en células de la eritroleucemia murina (MEL) y células HeLa en donde la sobre-expresión de cFtH genera un fenotipo deficiente de hierro con una reducción del LIP citosólico, aumento en los

niveles de TfR, un aumento en la actividad IRP y una disminución en la síntesis de hemoglobina (Andrews y col., 1992; Sammarco y col., 2008). Las células también muestran una menor producción de ROS después de la exposición a peróxido de hidrógeno en comparación a las células control (Cozi y col., 2000; Hintze y Theil, 2006; Picard y col., 1996). Todas estas manifestaciones son modificadas con la suplementación de hierro, indicando que todas ellas son asociadas a una deficiencia celular de hierro. cFtH y la presencia de su centro ferroxidasa son esenciales para la incorporación del hierro a la ferritina, pero es potencialmente importante en la regulación del estado redox de la célula, al remover el hierro Fe^{+2} el que es potencialmente tóxico. cFtH es esencial para la célula y una delección de este gen produce la letalidad a estados tempranos de embriogénesis (Ferreira y col., 2001)

Estudios de sobre-expresión de cFtL en células HeLa no muestran un aumento en la capacidad de almacenamiento de hierro en ferritina y no existen alteraciones en el metabolismo del hierro en estas células (Goralska y col., 2001; Mumford y col., 2000). Estos resultados y los entregados por otras investigaciones han llevado a pensar que la cFtL no cumple un rol fisiológico importante, sin embargo, recientes investigaciones han identificado nuevos desórdenes neurológicos asociados a mutaciones en el gen de cFtL (Vidal y col., 2008).

El estudio de cFtH en las células SH-SY5Y expuestas a diferentes tratamientos con hierro, mostró un aumento en los niveles de la proteína proporcionales al aumento en el contenido de hierro extracelular, este aumento es esencial para la incorporación del hierro en exceso en la proteína. No se observaron cambios en la expresión de ARNm a los

diferentes tratamientos con hierro a las 24 y 48 horas, lo que ha sido reportado anteriormente en otros tipos celulares (White y Munro, 1988; Cairo y col., 1985). Modificaciones en los niveles del ARNm de cFtL solamente han sido observadas en células HeLa, ranas y en ratas bajo la exposición crónica a dosis extremadamente elevadas de hierro. Principalmente estos cambios son asociados al daño oxidativo inducido por hierro, en vez de una respuesta directa del hierro y en donde participarían elementos de respuesta antioxidante ARE (Antioxidant response element) presentes río arriba de las cFtH y cFtL. Por lo que las modificaciones observadas en los niveles de la proteína cFtH se deberían a cambios en la actividad de las IRPs y los IRE presentes en cFtH

Una disminución en la expresión de la proteína cFtH fue observada a las 24 horas en condiciones de deficiencia de hierro, lo que posiblemente se relaciona con una disminución del hierro presente en el citosol y un menor requerimiento de la proteína que almacena a este metal. Los cambios de expresión de la proteína cFtH fueron dependientes del tiempo de exposición a las diferentes concentraciones de hierro en el medio extracelular. No se observaron cambios en cFtH a las 48 horas en condiciones de deficiencia de hierro en comparación con la situación control (Figura 5). Un resultado interesante, muestra una disminución de los niveles de cFtH en células expuestas a sobrecarga de hierro por un tiempo prolongado de 48 horas. Esto podría ser explicado por una mayor saturación de la ferritina, la que en condiciones normales contiene entre 800 y 1000 átomos de hierro por molécula y que en condiciones de sobrecarga de hierro es capaz de almacenar hasta 4500 átomos de este metal. Una mayor cantidad de hierro almacenado en esta molécula genera una menor cantidad de hierro LIP citosólico y protección celular, controlando los niveles de este metal y un menor requerimiento de esta sub-unidad. Otra posible explicación para este

resultado encontrado, es la dada por una disminución de los niveles de hierro celulares producido por un eflujo de hierro desde las células SH-SY5Y expuestas a condiciones de sobrecarga de hierro. Este eflujo es mediado por un aumento del exportador de hierro presente en la membrana plasmática, Ireg1, lo que anteriormente ha sido reportado por nuestro laboratorio (Aguirre y col., 2005). Además, se ha demostrado que un aumento Ireg1, genera una disminución del hierro celular incluyendo una disminución del hierro almacenado en ferritina (Nemeh y col., 2004) y esto induce la degradación de las subunidades de esta proteína a través del sistema ubiquitina-proteosoma (De Domenico y col., 2006). Estos resultados reflejan un mecanismo celular adaptativo a condiciones de sobrecarga de hierro y ferritina en conjunto con otras proteínas posiblemente permiten una defensa concertada en contra los insultos oxidativos producidos por hierro.

4.2 Rol MtFt en células neuronales expuestas a diferentes tratamientos de hierro extracelular

MtFt humana es expresada como un precursor con destinación a mitocondria, el cual es procesado en una proteína funcional con una estructura muy similar a la de cFt. MtFt incorpora hierro *in vivo* e *in vitro* de manera eficiente como cFtH. La principal diferencia con cFt es su estructura cuaternaria: cFt es un hetero-polímero, mientras que MtFt es un homo-polímero que solamente se ensambla después del procesamiento en la mitocondria. El descubrimiento de MtFt resuelve un resultado antiguo. Por cerca de 40 años, depósitos de hierro en la mitocondria han sido identificados por microscopía electrónica como centros de hierro similares a los observados en ferritina citosólica (Bessis y Breton-Gorius, 1962), pero la posibilidad de la existencia de una proteína similar a la

ferritina en este organelo fue abandonada por años. El reciente descubrimiento de esta y otras proteínas mitocondriales implicadas en el metabolismo de hierro, han hecho que la mitocondria sea considerada como un componente esencial en el metabolismo del hierro celular.

En este trabajo mostramos que a diferencia de lo observado y lo reportado anteriormente para cFt, los niveles de ARNm de MtFt responden a diferentes concentraciones de hierro presente en el medio extracelular (Figura 6). Esta es la primera evidencia que muestra que los niveles de MtFt son modificados por hierro a niveles transcripcionales. Esto indica que el tipo de regulación de MtFt es diferente al ya conocido para cFt. Estudios preliminares de la región promotora indican sitios potenciales de unión a factores eritroides específicos como GATA y NFE2, además de la identificación de posibles sitios de unión de factores inflamatorios y de estrés como NF κ B, CREB, API y Oct1, sin embargo la funcionalidad de estos factores aún no han sido determinados (Levi y col., 2001).

El aumento en los niveles del ARNm (Figura 6) y de la proteína de MtFt (Figura 7) en condición de sobrecarga de hierro a las 24 y 48 horas, indican una posible regulación mediada por factores de unión a ADN que podrían responder a un aumento en los niveles de estrés oxidativo inducido por hierro. El aumento en los niveles de proteína es proporcional al aumento en el contenido de hierro extracelular, este aumento es apoyado por lo reportado en otros trabajos que postulan que la principal función de MtFt es almacenar el hierro en exceso presente en la mitocondria. Sobre la base de estos antecedentes, es posible que cFt y MtFt responden concertadamente en condiciones de

sobrecarga de hierro aumentando los niveles de ambas proteínas, lo que permitiría una disminución del hierro en exceso tanto en el citosol como en la mitocondria y la consecuente protección del daño oxidativo celular luego de 12 y 24 horas de tratamiento.

Además, en este trabajo se muestra por primera vez un aumento en los niveles de ARNm (Figura 6) y de la proteína (Figura 7) en condiciones de bajo hierro. El aumento en la expresión de MtFt fue completamente diferente al observado para cFt, cuya expresión disminuye en condiciones de deficiencia de hierro. Esto indicaría diferencias en los mecanismos de regulación y de la posible función que tendría MtFt en el metabolismo celular y mitocondrial del hierro. Una posibilidad es que el aumento de los niveles de MtFt en condiciones de bajo hierro tenga como finalidad asegurar un suplemento adecuado del hierro entrante a este organelo. Es por esto que a pesar de las evidencias que indicarían que el hierro almacenado en MtFt esta menos biodisponible que el hierro presente en cFt (Nie y col., 2005), el hierro incorporado en MtFt en condiciones de deficiencia de hierro debería estar biodisponible para la síntesis de complejo Fe-S y grupos Hem.

Los cambios de expresión de la proteína (Figura 7) fueron dependientes del tiempo de exposición, observando una disminución a las 48 horas de tratamiento 150 μ M. Esta disminución posiblemente refleja un mecanismo celular y mitocondrial adaptativo a las condiciones de sobrecarga de hierro y que tienden a disminuir los niveles de hierro en la célula, un comportamiento similar al observado en cFt.

La Figura 12 muestra un modelo sobre la posible regulación de la expresión de MtFt en condiciones de deficiencia y sobrecarga de hierro.

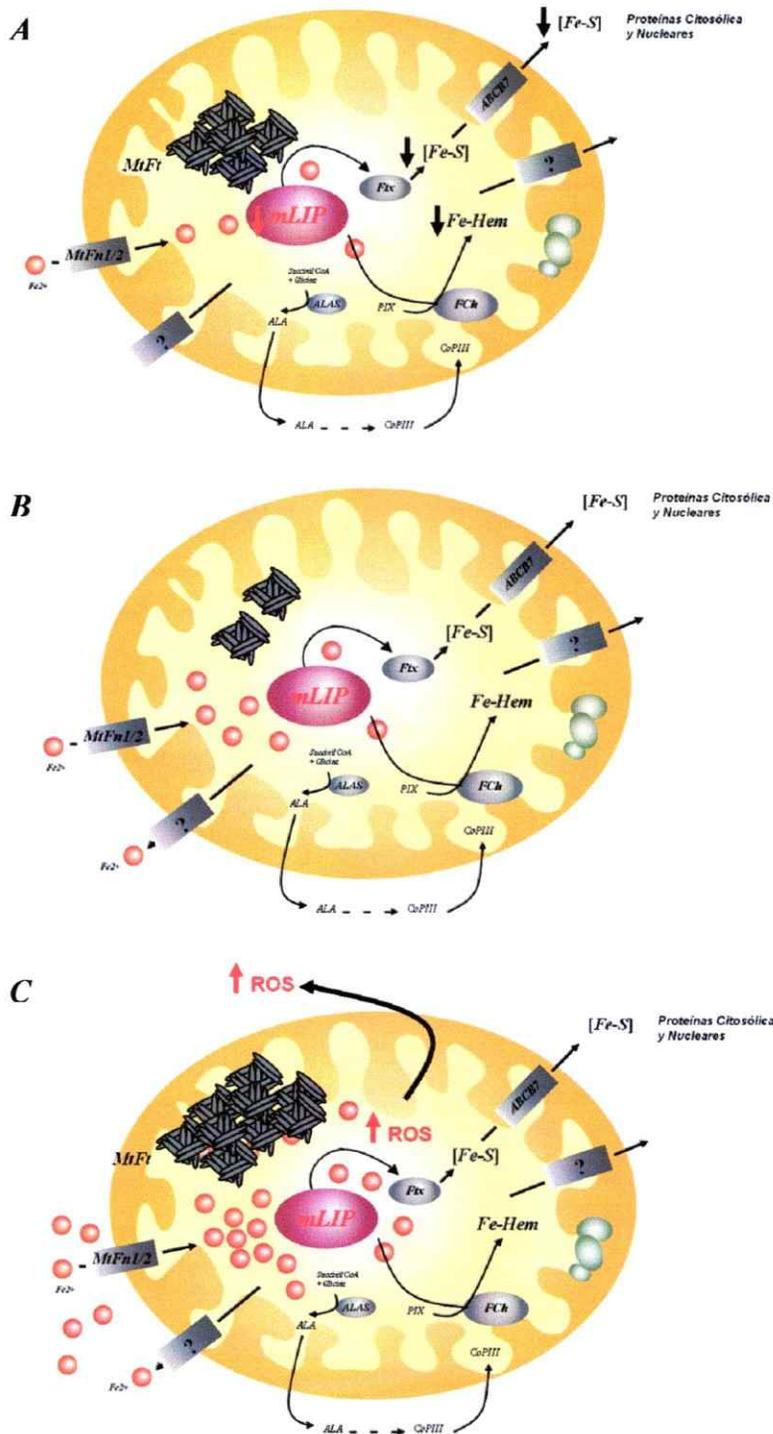


Figura 12 | Modelo de expresión de MtFt en neuronas expuestas a variadas concentraciones de hierro extracelular. A) En la mitocondria, la expresión de MtFt aumenta en condiciones de deficiencia de hierro (2 μM), esto permitiría asegurar un suministro adecuado de hierro hacia la mitocondria, permitiendo la síntesis de complejos Fe-S y grupos Hem. B) condición control (7 μM). C) La expresión de MtFt aumenta en condiciones de sobrecarga de hierro (60 μM y 150 μM) esto podría proteger a la mitocondria del daño oxidativo contrarrestando el exceso de este metal.

4.3 Distribución subcelular del hierro en neuronas.

Existe desconocimiento sobre la distribución del hierro entre el citosol y la mitocondria y los posibles mecanismos que la regulan. Aunque el papel de la mitocondria en la regulación de la homeostasis celular de este metal no es conocido, la evidencia disponible apoya la hipótesis que la mitocondria es un compartimiento central dentro de esta homeostasis. Además, siendo la mitocondria un sitio de producción fisiológica de especies reactivas, la existencia de un sistema de almacenamiento seguro del hierro entrante podría evitar la reacción de Fenton y la producción ROS.

La exposición de las células neuronales en condiciones de sobrecarga de hierro muestra un aumento en la incorporación del hierro celular total paralelo a un aumento de la concentración del metal en el medio de cultivo (Figura 11). Esto se relaciona con las observaciones que indican una acumulación intracelular progresiva del hierro a lo largo de la vida y a pesar del aumento de la concentración de cFt, el contenido de hierro celular total y pool celular de hierro reactivo se incrementa con la exposición a hierro. Muy interesante es el resultado que revela que en condiciones de deficiencia de hierro, la incorporación de este metal es destinada principalmente hacia la mitocondria lo que indicaría la existencia de un mecanismo celular que tendría como finalidad asegurar un suplemento adecuado del hierro entrante a este organelo. El estudio de los niveles de hierro mitocondrial reveló que en condiciones de sobrecarga de hierro, la mitocondria juega un papel central como moderador de los niveles citosólicos de este metal y el exceso de hierro es almacenado principalmente en este organelo (Figura 11). Debido al potencial daño oxidativo que puede causar la presencia del hierro en exceso en la mitocondria, es necesario determinar si este

hierro es secuestrado en MtFt. Este antecedente es esencial para determinar si MtFt posee una mayor capacidad que cFt para captar y proteger del daño oxidativo causado por un exceso de hierro en las células neuronales. Además, estos datos indicarían que la mitocondria y posiblemente MtFt juega un rol central en la protección neuronal, y una posible acumulación crónica de hierro guía a una desregulación de los mecanismos implicados en la mantención de los niveles basales de este metal, un aumento en el estrés oxidativo y la muerte neuronal.

5. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se encontraron resultados relevantes que abren nuevos campos en la investigación de la homeostasis celular y mitocondrial del hierro. En particular, se demostró que en las células neuronales SH-SY5Y la MtFt responde a cambios en el contenido extracelular de hierro. El descubrimiento del aumento en los niveles de MtFt en condiciones de deficiencia de hierro podría tener como propósito asegurar el suministro de hierro entrante a la célula hacia la mitocondria, permitiendo una adecuada síntesis de complejos Fe-S y grupos Hem. El aumento en los niveles de MtFt en condiciones de sobrecarga de hierro podría proteger a la mitocondria del daño oxidativo contrarrestando el exceso de este metal.

La regulación de la expresión de MtFt posiblemente se realice a nivel transcripcional, mediada por dos tipos de señales. Una señal mediada por bajos niveles de hierro, que induciría la expresión de MtFt, asegurando un suministro adecuado del hierro hacia este organelo. En esta señal podrían participar sensores de los niveles de hierro reactivo mitocondrial, de la síntesis de los complejos Fe-S o de la síntesis de grupos hem. Otra señal podría estar dada en condiciones de sobrecarga de hierro en la que podrían participar sensores de estrés oxidativo. Esta señal induciría el aumento de los niveles de MtFt, protegiendo a la mitocondria del daño oxidativo causado por un exceso de este metal.

6. REFERENCIAS

- Aguirre, P., Mena, N., Tapia, V., Arredondo, M. and Núñez, M.T. (2005) Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci* 6:3.
- Aguirre, P., Valdés, P., Aracena-Parks, P., Tapia, V. and Núñez, M.T. (2007) Upregulation of gamma-glutamate-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SHSY-5Y cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C2197-203.
- Aisen, P. (1992) Entry of iron into cells: a new role for the transferrin receptor in modulating iron release from transferrin. *Ann Neurol*. 32 Suppl:S62-8.
- Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997a) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem*. 1997 69:1196-203.
- Alam, Z.I., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997b) A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem*. 69:1326-9.
- Ames A. (2000) CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34: 42-68.
- Andrews, S.C., Arosio, P., Bottke, W., Briat, J.F., von Darl, M., Harrison, P.M., Laulhère, J.P., Levi, S., Lobreaux, S. and Yewdall, S.J. (1992) Structure, function, and evolution of ferritins. *J Inorg Biochem*. 47:161-74.
- Andrews, N.C. (1999) The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol*. 31:991-4.
- Arosio, P. and Levi, S. (2002) Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 33:457-63.
- Arredondo, M., Orellana, A., Gárate, M.A. and Núñez, M.T.(1997) Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol*. 273(2 Pt 1):G275-80.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W. and Vercellotti, G.M. (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 267:18148-53.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Fasold, M.B., Barrera, C.M. and Augereau, G.(1988) Studies of the slow bidirectional transport of iron and transferrin across the blood-brain barrier. *Brain Res Bull*. 21:881-5.

- Bartlett, W.P., Li, X.S. and Connor, J.R. (1991) Expression of transferrin mRNA in the CNS of normal and jimpy mice. *J Neurochem.* 1991 Jul; 57(1):318-22.
- Bartzokis, G., Beckson, M., Hance, D.B., Marx, P., Foster, J.A. and Marder, S.R. (1997) MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males. *Magn Reson Imaging.* 15:29-35.
- Bessis, M.C. and Breton-Gorius J. (1962) Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. *Blood* 19:635-63.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R. and Bishop, D.F. (2000) Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood.* 96:3256-64.
- Brodie, A. E. and Reed, D. R. (1987) Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 148:120-5
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. and Sheu, S.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-C833.
- Burdo, J.R. and Connor, J.R. (2003) Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals.* 16:63-75.
- Cairo, G., Bardella, L., Schiaffonati, L., Arosio, P., Levi, S. and Bernelli-Zazzera, A. (1985) Multiple mechanisms of iron-induced ferritin synthesis in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 314-321.
- Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F. and Nakase, Y. (1979) Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem.* 254:4764-71.
- Chaston T.B. and Richardson, D.R. (2003) Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. *Am J Hematol.* 73:200-10.
- Connor, J.R., Menzies, S.L., St Martin, S.M. and Mufson, E.J. (1990) Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res.* 27: 595-611.
- Connor, J.R., Snyder, B.S., Beard, J.L., Fine, R.E. and Mufson, E.J. (1992) Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 31: 327-35.

Connor, J. R., Boeshore, K. L., Benkovic, S. A. and Menzies, S. L. (1994) Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J. Neurosci. Res.* 37: 461–465.

Cozzi, A., Corsi, B., Levi, S., Santambrogio, P., Albertini, A. and Arosio, P. (2000) Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem.* 275:25122-9.

De Domenico, I., Vaughn, M.B., Li, L., Bagley, D., Musci, G., Ward, D.M. and Kaplan J. (2006) Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J.* 25:5396-404.

Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 52:1830-6.

Dickey, L. F., Sreedharan, S., Theil, E. C., Didsbury, J. R., Wang, Y.H. and Kaufman, R. E. (1987) Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin. A comparison of three distinct ferritin complementary DNAs, the corresponding subunits and identification of the first processed in amphibia. *J. Biol. Chem.* 262: 7901–07.

Drysdale, J., Arosio, P., Invernizzi, R., Cazzola, M., Volz, A., Corsi, B., Biasiotto, G. and Levi, S. (2002) Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 29:376-83.

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C. and Comella, J.X. (2000) Sequential treatment of SHSY-5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 75:991-1003.

Erecinska, M., Cherian, S. and Silver, I.A. (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73: 397–445.

Ferreira, C., Santambrogio, P., Martin, M.E., Andrieu, V., Feldmann, G., Hélin, D. and Beaumont, C. (2001) H ferritin knockout mice: a model of hyperferritinemia in the absence of iron overload. *Blood.* 98:525-32.

Garrido, C. and Kroemer, G. (2004) Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 16:639-46.

Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. and Rizzuto, R. (2008) Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med.* 8:119-30.

Goralska, M., Holley, B.L. and McGahan, M.C. (2001) Overexpression of H- and L-ferritin subunits in lens epithelial cells: Fe metabolism and cellular response to UVB irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:1721-7.

Götz, M.E., Double, K., Gerlach, M., Youdim, M.B. and Riederer, P. (2004) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci.* 1012:193-208.

Hallgren, B. and Sourander, P. (1958) The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem.* 3:41-51.

Harrison, P.M. and Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1275:161-203.

Hentze, M.W. and Kühn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:8175-82.

Hill, J.M. (1985) Iron concentration reduced in ventral pallidum, globus pallidus, and substantia nigra by GABA-transaminase inhibitor, gamma-vinyl GABA. *Brain Res.* 342:18-25.

Hintze, K.J. and Theil, E.C. (2005) DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:15048-52.

Hintze, K. J. and Theil, E. C. (2006) Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins *Cell. Mol. Life Sci.* 63:591-600.

Hirsh, M., Konijn, A.M. and Iancu, T.C. (2002) Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells. *J Hepatol.* 36:30-8.

Kalantar-Zadeh, K., Kalantar-Zadeh, K. and Lee, G.H. (2006) The fascinating but deceptive ferritin: to measure it or not to measure it in chronic kidney disease? *Clin J Am Soc Nephrol.* 1 Suppl 1:S9-18.

Koeppen, A.H. (1995) The history of iron in the brain. *J Neurol Sci.* 1995 Dec;134 Suppl:1-9.

Langlois d'Estaintot, B., Santambrogio, P., Granier, T., Gallois, B., Chevalier, J.M., Précigoux, G., Levi, S. and Arosio, P. (2004) Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant Ser144Ala. *J Mol Biol.* 340:277-93.

Leggett, B. A., Fletcher, L. M., Ramm, G. A., Powell, L. W. and Halliday, J. W. (1993) Differential regulation of ferritin H and L subunit mRNA during inflammation and long-term iron overload. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 8: 21-7.

Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P. and Drysdale, J. (2001) A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem.* 276: 24437-40.

- Lill, R. and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25:352-6.
- Liu, X.S., Patterson, L.D., Miller, M.J. and Theil, E.C. (2007) Peptides selected for the protein nanocage pores change the rate of iron recovery from the ferritin mineral. *J Biol Chem.* 282:1821-1825.
- Martin, W.R., Ye, F.Q. and Allen, P.S. (1998) Increasing striatal iron content associated with normal aging. *Mov Disord.* 13:281-6.
- Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Joyce, J.N., Coleman, P.D., Kozik, B., Bellinger, D.L. and Rogers, J. (2008) Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* [Epub ahead of print].
- Miller, L.L., Miller, S.C., Torti, S.V., Tsuji, Y. and Torti, F.M. (1991) Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:4946-50.
- Missirlis, F., Holmberg, S., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Rouault, T.A. and Law, J.H. (2006) Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:5893-8.
- Moos, T. and Morgan, E.H. (2004) The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann NY and Acad Sci.* 1012:14-26.
- Muckenthaler, M., Richter, A., Gunkel, N., Riedel, D., Polycarpou-Schwarz M., Hentze S. and col. (2003) Relationships and distinctions in iron-regulatory networks responding to interrelated signals. *Blood* 101: 3690-98.
- Mumford, A.D., Cree, I.A., Arnold, J.D., Hagan, M.C., Rixon, K.C. and Harding, J.J. (2000) The lens in hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome contains crystalline deposits of L-ferritin. *Br J Ophthalmol.* 84:697-700.
- Napier, I., Ponka, P. and Richardson, D.R. (2005) Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood.* 105:1867-74.
- Nie, G., Sheftel, A.D., Kim, S.F. and Ponka, P. (2005) Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis. *Blood.* 105:2161-7.
- Núñez, M.T., Núñez-Millacura, C., Tapia, V., Muñoz, P., Mazariegos, D., Arredondo, M., Mura, C. and Maccioni, R.B. (2003) Iron-activated iron uptake: a positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1. *Biometals.* 16:83-90.
- Ogg, R.J., Langston, J.W., Haacke, E.M., Steen, R.G. and Taylor, J.S. (1999) The correlation between phase shifts in gradient-echo MR images and regional brain iron concentration. *Magn Reson Imaging.* 17:1141-8.

Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V. and Torti, F.M. (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J.* 357(Pt 1):241-7.

Pählman, S., Hoehner, J.C., Nånberg, E., Hedborg, F., Fagerström, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E., and col. (1995) Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 31A:453-8. Review.

Pandolfo, M. (2002). Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* 2(1-2):87-93.

Papanikolaou, G. and Pantopoulos, K. (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 202:199-211.

Picard, V., Renaudie, F., Porcher, C., Hentze, M.W., Grandchamp, B. and Beaumont, C. (1996) Overexpression of the ferritin H subunit in cultured erythroid cells changes the intracellular iron distribution. *Blood.* 87:2057-64.

Ponka, P. (1997) Tissue-specific regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood* 89: 1-25.

Presgraves, S.P., Ahmed, T., Borwege, S. and Joyce, J.N. (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res.* 5:579-98.

Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. and Koenig, M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet.* 27(2):181-6.

Richardson, D.R. and Ponka, P. (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1331:1-40. Review.

Rouault, T.A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 2: 406-14.

Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rötig A. (1999) Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet.* 354(9177):477-9.

Sammarco, M.C., Ditch, S., Banerjee, A. and Grabczyk, E. (2008) Ferritin L and H subunits are differentially regulated on a post-transcriptional level. *J Biol Chem.* 283:4578-87.

Sheftel, A.D., Zhang, A.S., Brown, C., Shirihai, O.S. and Ponka P. (2007) Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood.* 110:125-32.

Stohs, S.J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 18:321-36.

Sturm, B., Goldenberg, H. and Scheiber-Mojdehkar, B. (2003) Transient increase of the labile iron pool in HepG2 cells by intravenous iron preparations. *Eur J Biochem.* 270:3731-8.

Tapia, V., Arredondo, M. and Núñez, M.T. (1996) Regulation of Fe absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status. *Am J Physiol.* 271(3 Pt 1):G443-7.

Torti, F.M. and Torti, S.V. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 99:3505-16.

Vidal, R., Miravalle, L., Gao, X., Barbeito, A.G., Baraibar, M.A., Hekmatyar, S.K., Widel, M., Bansal, N., Delisle, M.B. and Ghetti, B. (2008) Expression of a mutant form of the ferritin light chain gene induces neurodegeneration and iron overload in transgenic mice. *J Neurosci.* 28:60-7.

Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407.

Wardman, P. and Candeias, L.P. (1996) Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res.* 145:523-31.

White, K. and Munro, H. N. (1988) Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. *J. Biol. Chem.* 263: 8938-42.

Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. and Cortopassi G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet.* 8(3):425-30.

Wu, L.J., Leenders, A.G., Cooperman, S., Meyron-Holtz, E., Smith, S., Land, W., Tsai, R.Y., Berger, U.V., Sheng, Z.H. and Rouault, T.A. (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1001:108-17.

Youdim, M.B., Ben-Shachar, D., Yehuda, S. and Riederer, P. (1990) The role of iron in the basal ganglion. *Adv Neurol.* 53:155-62.

Zancani, M., Peresson, C., Biroccio, A., Federici, G., Urbani, A., Murgia, I., Soave, C., Micali, F., Vianello, A. and Macri, F. Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur J Biochem.* 271:3657-64.

Zecca, L., Gallorini, M., Schünemann, V., Trautwein, A.X., Gerlach, M., Riederer, P., Vezzoni, P. and Tampellini, D. (2001) Iron, neuromelanin and ferritin content in the

substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem* 76:1766-73.

Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R. and Crichton, R.R. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 5:863-73.