

UCH-FC
DOC-B
A 774
C.1

**“Rol regulador de la proteína HFE en el metabolismo
intracelular de Fe”.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

Por

Miguel Armando Arredondo Olguín

Agosto, 2002



Director de Tesis: Dr. Marco Tulio Núñez.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Miguel Armando Arredondo Olguín

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día ____ de Agosto de 2002.

Director de Tesis:

Dr. Marco Tulio Núñez

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Luis Valladares

Dr. Alfonso González

Dr. Ricardo Maccioni

Dr. José Chianale

Esta tesis fue financiada por Proyecto FONDECYT 2990116 de Miguel Arredondo Olgún e Instituto Milenio para estudios Avanzados en Biología y Biotecnología N° P99-031F del Dr. M. Tulio Núñez.

A mis hijas Paula y Carolina, por ser el motivo de mi vida.

A Lilian, por tu coraje y valentía en estos años de lucha.

A mi Madre, por ser guía anónima de mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Tulio Núñez, por creer en mi, por aceptarme una vez más en su laboratorio, por sus consejos durante el desarrollo de esta tesis y por permitirme desarrollar mis propias inquietudes.

A mis compañeros del Laboratorio de Microminerales y autoridades del INTA, por darme la oportunidad de llevar a feliz término esta actividad.

A los Drs. Alfonso González, Luis Valladares y Ricardo Maccioni, por sus críticas, aportes constructivos y disposición para la culminación de este escrito.

A Patricia, Victoria, Claudia y Lorena por su amistad y ayuda desinteresada.

A los miembros del laboratorio de Membranas: Carlos, Viviana, Raúl, Andrés, Pabla, Dora, Pablo, Cato, Casilda. Por hacer más llevaderas las largas jornadas.

A todos los que de una u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo.

INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCION	1
Objetivo General	21
Hipótesis de Trabajo	21
Objetivos Específicos	22
2. MATERIALES Y METODOS	24
2.1 Materiales,	24
2.1.1 Reactivos	24
2.1.2 Equipos	25
2.1.3 Materiales de Cultivo	26
2.1.4 Material biológico	26
2.2 Metodos	28
2.2.1 Cultivo celular	28
2.2.2 Obtención de cDNA y transfección de células Caco-2	28
2.2.3 Morfología celular	30
2.2.4 Obtención de células Caco-2 con distintas concentraciones de hierro intracelular	30
2.2.5 Determinación del pool de hierro lábil (LIP)	31
2.2.6 Estudios de la proteína IRP	31
2.2.7 Estudios de captación y transporte de Fe ¹² y Fe ¹³	34
2.2.8 Estudios de captación y transporte de Fe y Cu en presencia de Oligonucleótidos antisentido de DMT1	35
2.2.9 Estudios de captación apical y transporte apical-basolateral de ⁶⁴ Cu	36
2.2.10 Estudios de competencia en la captación y transporte de Fe en presencia de Cu	36
2.2.11 Anticuerpos e inmunodetección de HFE	37
2.2.12 Anticuerpos e inmunodetección de DMT1	37
2.2.13 Anticuerpos e inmunodetección de RTf	38
2.2.14 Anticuerpos e inmunodetección de ferritina	38
2.2.15 Anticuerpos e inmunodetección de β2-microglobulina	38
2.2.16 Glicosilación en DMT1	39
2.2.17 Localización intracelular de HFE y DMT1 por microscopía confocal	39
2.2.18 Estudios de Biotinilación de HFE y H63D	40
2.2.19 Estudios de captación y transporte de Fe-Tf en presencia de péptidos Sintéticos de HFE	41
2.2.20 Estudios de la vida media de DMT1	42
2.2.21 Estudios de interacción entre HFE, DMT1 y RTf	44
2.2.22 Análisis estadístico	46
3. RESULTADOS	47
3.1 Morfología celular en células Caco-2 que sobreexpresan HFE	47
3.2 Expresión de la proteína HFE en Células Caco-2 que sobreexpresan HFE y HFE-H63D	49
3.3 Contenido intracelular de hierro en células Caco-2 que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D	50
3.4 Determinación del pool de hierro lábil	52

3.5	Niveles de Receptor para transferrina y Ferritina	54
3.6	Estudios de los niveles de las proteínas IRP: inmunodetección de IRP	56
3.7	Estudio de la actividad de las proteínas IRP: ensayo de actividad	57
3.8	Experimentos de captación y transporte de ⁵⁹ Fe-NTA	59
3.9	Experimentos de captación y transporte de ⁵⁹ Fe-ascorbato	62
3.10	Niveles del transportador DMT1	64
3.11	Estudios de deglicosilación de DMT1	66
3.12	Estudio de la vida media del transportador DMT1	68
3.13	Estudios de captación y transporte de Fe y Cu en presencia de Oligonucleótidos antisentido de DMT1	71
3.14	Estudios de captación y transporte de Cu en células Caco-2 con distintas concentraciones de Fe	73
3.15	Estudios de competencia en la captación y transporte de Fe en presencia de Cu	75
3.16	Expresión de la proteína β2-microglobulina en células que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D	77
3.17	Distribución del transportador DMT1 y HFE en células Caco-2 que sobreexpresan la proteína wtHFE, 79	79
3.18	Inmunolocalización de HFE en células que sobreexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D, 82	82
3.19	Inmunolocalización de DMT1 en células que sobreexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D, 86	86
3.20	Estudios de internalización basolateral de Fe-Tf en presencia de péptidos sintéticos de HFE, 89	89
4.	APENDICE 1	92
5.	DISCUSION	99
6.	COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIONES	120
7.	BIBLIOGRAFIA	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A) Morfología de células Caco-2 transfectadas con HFE. B) Análisis densitométrico eje apical-basolateral C) Modelo de las células en estudio.	47
Figura 2	Inmunodetección de HFE en células Caco-2 que sobreexpresan HFE.	49
Figura 3	Contenido intracelular de Fe en células Caco-2 que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D. A) Contenido intracelular de Fe individual. B) Contenido intracelular de Fe promedio.	51
Figura 4	Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP).	53
Figura 5	A) Receptor para transferrina en células Caco-2 transfectadas con wtHFE B) Ferritina intracelular en células Caco-2 transfectadas con wtHFE	54 55
Figura 6	Estudio de las proteínas reguladoras de Fe: Inmunodetección de las proteínas IRPs.	56
Figura 7	Estudio de las proteínas reguladoras de Fe: Actividad de unión a IRE de las proteínas IRP. A) Plasmidio pSPT-Fer. B) Gel de ensayo de actividad. C) Densitometría	57
Figura 8	Cinéticas de Captación apical y transporte apical-basolateral de $^{59}\text{Fe}^{+2}$:NTA por células Caco-2 transfectadas con HFE. A) Curso temporal de captación apical de ^{59}Fe en células Caco-2 que fueron crecidas en diferentes concentraciones de ^{55}Fe extracelular. B) Curso temporal de transporte apical-basolateral de ^{59}Fe en células Caco-2. C) Cinética de captación apical de ^{59}Fe en células Caco-2 que sobreexpresan HFE. D) Cinética de transporte apical-basolateral de ^{59}Fe en células Caco-2 que sobreexpresan HFE.	61
Figura 9	Cinéticas de Captación apical y transporte apical-basolateral de $^{59}\text{Fe}^{+2}$:Ascorbato por células Caco-2 transfectadas con HFE. A) Comparación captación apical de Fe^{+3} y Fe^{+2} en células Caco-2 controles. B) Cinética de captación de $^{59}\text{Fe}^{+2}$ en células Caco-2 que sobreexpresan HFE. C) Curso temporal de captación apical de $^{59}\text{Fe}^{+2}$ en células incubadas con 5 μM de Fe en el medio de cultivo.	63
Figura 10	Inmunodetección de DMT1 en células Caco-2 que sobreexpresan	65

	HFE:	
	A) Inmunodetección de DMT1	
	B) Análisis densitométrico	
	C) Estudios de especificidad del anticuerpo anti DMT1: Competencia con el péptido DMT1.	
Figura 11	Estudios de deglicosilación de DMT1.	67
Figura 12	Estudio de la vida media del transportador DMT1.	69
	A) RT-PCR en células controles, wtHFE, HFE-H63D.	
	B) Análisis densitométrico de geles de RT-PCR.	
	C) Análisis de RNA por Northern blot de células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D.	
	D) Análisis de RNA por Northern blot de células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D en presencia de actinomicina D.	
	E) Análisis densitométrico de Northern blot	
Figura 13	A) Captación apical y transporte apical-basolateral de ⁵⁹ Fe por células Caco-2 transfectadas con HFE en presencia de oligonucleótidos antisentido de DMT1.	71
	B) Captación apical de ⁵⁹ Fe y ⁶⁴ Cu por células Caco-2 en presencia de oligonucleótidos antisentido de DMT1.	
Figura 14	Captación apical y Transporte apical-Basolateral de ⁶⁴ Cu por células Caco-2 que sobrepresan wtHFE y HFE-H63D.	74
	A) Cinética de captación apical de ⁶⁴ Cu.	
	B) Curso temporal de captación apical de ⁶⁴ Cu.	
	C) Curso temporal de transporte apical-basolateral de ⁶⁴ Cu	
Figura 15	Captación apical y transporte apical-basolateral de ⁵⁹ Fe en presencia de ⁶⁴ Cu por células Caco-2.	75
	A) Captación apical de Fe	
	B) Cinéticas de captación apical de Fe	
	C) Transporte apical-basolateral	
	D) Cinética de transporte apical-basolateral.	
	E) Cinética de inhibición de captación entre Fe y Cu.	
Figura 16	Inmunodetección de β2-microglobulina en células Caco-2 que sobrepresan HFE	78
	A) Inmunodetección de β2-microglobulina.	
	B) Análisis densitométrico	
Figura 17	Distribución de DMT1 y HFE en células Caco-2 que sobrepresan HFE.	81
	A) Expresión de DMT1 en membrana apical y basolateral.	
	B) Análisis densitométrico	
	C) Expresión de HFE en la membrana apical y basolateral.	

	D) Análisis densitométrico.	
	E) Expresión de RTf en membrana apical y basolateral.	
Figura 18	Inmunolocalización de HFE en células Caco-2 que sobreexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D.	84
	A) Inmunolocalización de HFE en células controles, wtHFE y HFE-H63D.	
	B) Inmunolocalización en el eje apical-basolateral.	
	C) Análisis de la distribución celular de HFE en el eje basolateral-apical.	
	D) Modelo propuesto de la distribución de la proteína HFE.	
Figura 19	Inmunolocalización de DMT1 en células Caco-2 que sobreexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D.	87
	A) Inmunolocalización de la proteína HFE en células controles, wtHFE y HFE-H63D.	
	B) Inmunolocalización en el eje basolateral-apical.	
	C) Análisis de la distribución celular de HFE en el eje basolateral-apical.	
	D) Modelo propuesto de la distribución de la proteína HFE.	
Figura 20	A) Estudios de interacción entre la proteína HFE y el receptor para transferrina: Inhibición en la internalización de ⁵⁹ Fe-Tf por péptidos de HFE. Efecto de diferentes concentraciones de Tf-Fe.	89
	B) Modelo de interacción de HFE y RTf	91
	B1) Interacción HFE y RTf	
	B2) Dominio $\alpha 1$ y RTf	
	B3) Péptido B y RTf	
Figura 21	A) Modelo sistema doble híbrido MatchMaker Gal4 Two Hybrid System.	93
	B) Sedimentación en gradientes de sacarosa: inmunodetección de DMT1.	96
	C) Sedimentación en gradientes de sacarosa: inmunodetección de HFE.	97
Figura 22	Mecanismo propuesto del transporte de Fe a través de la célula de epitelio intestinal: Regulación por sistema IRP/IRE.	99
Figura 23	Modelo propuesto para la relación entre la concentración de Fe intracelular y la actividad del sistema IRP/IRE en células de epitelio intestinal Caco-2.	100
Figura 24	Modelo propuesto para la acción de la proteína HFE en el metabolismo intracelular de Fe en células de epitelio intestinal.	103
Figura 25	Modelo de la homeostasis de Fe en células de epitelio intestinal normal	120

ABREVIATURAS

ARNm	: Acido ribonucleico mensajero
β_2 M	: β_2 -Microglobulina
BSA	: Albúmina sérica de bovino
cDNA	: Acido desoxirribonucleico complementario
Chelex 100	: Resina Quelante, ligando: ácido iminodiacético-Na
Cu	: Cobre
DMEM	: Medio mínimo esencial Dulbecco
DMT1	: Transportador de metales divalentes 1.
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
Fe	: Hierro
Fn	: Ferritina
HEPES	: N-[2-hidroxiometil] piperazina -N' [ácido 2-
etanosulfónico]	
HFE	: Proteína de la hemocromatosis hereditaria
HFE-H63D	: Proteína de la hemocromatosis hereditaria mutada en
H63D	
HH	: Hemocromatosis Hereditaria
HLA	: Complejo mayor de histocompatibilidad
HFE-RTf	: Complejo proteína HFE y Receptor para transferrina
IRE	: Elemento que responde a hierro
IRP	: Proteína reguladora de hierro
kD	: kiloDalton
LIP	: Contenido de hierro reactivo
MOPS	: Acido 3-[N-morfolino] propano sulfónico

NP40	: Targitol NP40 (nonifenoxi polietoxi etanol)
NTA	: N,N-bis [carboximetil] glicina, ácido triglicolámico
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	: Fenilmetilsulfonil fluoruro
RTf	: Receptor para transferrina
RTf-Tf	: Complejo Receptor para transferrina-Transferrina
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SFB	: Suero fetal de bovino
Tf	: Transferrina
Tween 20	: Polioxietilensorbitan monolaurato
wtHFE	: Proteína de la hemocromatosis hereditaria silvestre

RESUMEN

Las células del epitelio duodenal, son el principal sitio de absorción de hierro (Fe) dietario. El proceso de captación de Fe por estas células es regulado por la concentración intracelular de Fe y por el contenido de Fe reactivo. Existen dos mecanismos reconocidos de captación de Fe por estas células. La endocitosis de transferrina-Fe mediada por el receptor para transferrina presente en la membrana basolateral y la captación de Fe por el transportador DMT1 en la membrana apical. En la Hemocromatosis hereditaria (HH), enfermedad autosómica recesiva que afecta al metabolismo del hierro y que se caracteriza por una absorción intestinal aumentada de Fe, se produce una progresiva sobrecarga de hierro en diferentes órganos y tejidos. El mecanismo fisiológico por el cual HFE, proteína producto del gen normal de la HH, regula la absorción de Fe es aún poco conocido. Con la hipótesis que la proteína HFE silvestre regula la absorción intestinal de Fe, en este trabajo hemos caracterizado el efecto de la sobreexpresión de la proteína HFE en células tipo epitelio intestinal Caco-2. Encontramos que el efecto primario de la sobreexpresión de HFE es una marcada reducción en la captación apical de Fe, a pesar de un sistema regulatorio de Fe (IRP/IRE) activo y un aumento de 4 veces en la masa del transportador de metales divalentes DMT1. La sobreexpresión de HFE-H63D no indujo ninguno de los resultados anteriores. Hemos demostrado además, que el transportador DMT1 es el principal transportador apical de Fe y que también participa en el transporte de Cu. La sobreexpresión de wtHFE produjo un cambio en la distribución tanto de la proteína HFE

como del transportador DMT1. La expresión de wtHFE en la membrana apical podría ser explicada por un mecanismo de transitos. El cambio en la distribución de DMT1, no explica por sí solo los hallazgos encontrados en la hemocromatosis, ya que en la membrana apical el transportador DMT1 no desaparece. Por otra parte, la proteína HFE mutada en H63D pierde su capacidad de regular negativamente la actividad de DMT1. Puesto que la proteína mutada de HFE (C282Y) no llega a la membrana plasmática, el efecto inhibitorio sobre la absorción de Fe estaría perdido en la HH. Considerando el efecto inhibitorio de la proteína HFE sobre la captación de Fe demostrado aquí, se podría explicar la absorción aumentada de Fe en la HH, en donde la función normal de la proteína HFE con la mutación H63D se ha perdido. Más importantemente, sugerimos que la presencia de wtHFE en la membrana apical de las células controles permitiría una interacción directa entre wtHFE y DMT1 y podría producir así, la regulación sobre la actividad de DMT1.

ABSTRACT

Iron (Fe) absorption occurs principally in the duodenal epithelial cells. The Fe uptake is a highly regulated process by both intracellular Fe concentration and the labile iron pool. There are two Fe uptake mechanisms in the intestinal epithelial cells. Transferrin-Fe endocytosis mediated by the transferrin receptor in the basolateral membrane and Fe uptake mediated by DMT1 in the apical membrane. Hereditary hemochromatosis (HH) is a common autosomal recessive disorder of iron metabolism characterized by increased intestinal iron absorption, which leads to progressive iron overload. The physiological mechanisms by which HFE, the normal product of the HH gene regulates intestinal iron absorption are unknown, under the hypothesis that HFE regulates intestinal iron absorption. We characterized the effect of HFE overexpression on apical iron uptake in intestinal epithelial Caco-2 cells. We found that the primary effect of HFE overexpression was a marked reduction of apical iron uptake, despite a working IRE/IRP system and a four-fold increase in the mass of the iron transporter DMT1. HFE-H63D overexpression does not induce any of these results. We demonstrated that DMT1 is the main apical Fe transporter and that participated actively in apical Cu transport. HFE overexpression produced a change in the distribution of both HFE and DMT1. The presence of wtHFE in the apical membrane could be explained by a transcytosis process. However, DMT1 re-distribution is not the cause of the diminished apical iron uptake activity, and other mechanisms will have to be invoked to explain the marked decrease in apical iron uptake activity observed in HFE cells. The

H63D mutation produced a protein lacking its normal capacity to negatively regulate DMT1 activity. Since HFE-C282Y cannot reach the surface cell, this inhibitory effect over Fe uptake would be lost in HH. The inhibitory effect of HFE on apical iron uptake reported here provides an explanation for the increased absorption of iron observed in HH, where the normal function of HFE-H63D is lost. More importantly, we suggest that the presence of HFE in the apical membrane of control cells would allow for a direct interaction between HFE and DMT1 and could cause the DMT1 activity regulation by HFE.

1. INTRODUCCION

El hierro (Fe), es considerado el elemento traza más importante para la vida. Participa en procesos como transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y síntesis del DNA. El 70% del Fe inorgánico se encuentra en la hemoglobina y como Fe de depósito en forma de ferritina (Fn) o hemosiderina en el sistema reticuloendotelial y células del parénquima hepático. También, se encuentra en compartimentos cuantitativamente menores, como el Fe presente en mioglobina, Tf y en diversos sistemas enzimáticos (INACG, 1979). En condiciones normales, las células obtienen su Fe desde Tf mediante endocitosis mediada por el receptor para Transferrina (RTf) (Aisen and Brown, 1980; Weinberg, 1989). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, las células pueden incorporar Fe directamente desde el medio externo, en forma independiente de transferrina, a través de la membrana plasmática (Morgan, 1988). Esta incorporación es mediada por un transportador de membrana (Núñez et al., 1992), el cual está presente hasta el estadio de reticulocito durante el desarrollo del glóbulo rojo.

Regulación de los Niveles de Fe Celular.

La regulación del metabolismo intracelular de Fe se realiza a nivel post-transcripcional por las proteínas citoplasmáticas IRP1 e IRP2 (Iron Regulatory Proteins)

(Haile et al., 1992a; Emery-Goodman et al., 1993; Theil, E. 1993; Dix et al., 1993; Mascotti et al., 1995); IRE-BP (Iron Responsive Element Binding Protein) (Haile et al., 1989; Eisenstein et al., 1993); P90 (Walden et al., 1989) ó IRF (Iron Regulatory Factor) (Mullner et al., 1989). Ambas IRP regulan la expresión post-transcripcional de proteínas involucradas en la homeostasis y utilización de Fe (Guo et al., 1995a). IRP es codificada por un gen ubicado en el cromosoma 9 humano, al igual que el gen de la aconitasa mitocondrial (Beiner and Kennedy, 1993). IRP1 presenta una movilidad relativa de 98 kDa (Walden et al., 1989) y en su estructura cuatro dominios, de los cuales los dominios 1 al 3 se unen al dominio 4 por una unión tipo bisagra. Contiene además, un núcleo sulfuro-hierro 4Fe-4S entre los dominios 1-3 y 4 en equilibrio con un ordenamiento 3Fe-4S (Leibold and Guo, 1992; Rouault et al., 1992). Además, presenta una gran homología estructural con la aconitasa mitocondrial (Rouault et al., 1991). IRP1 posee actividad de unión a ARNm reversiblemente regulada por la concentración intracelular de Fe. A menor Fe interno mayor actividad de unión a ARNm y viceversa (Samaniego et al., 1994). El cambio en la actividad de IRP1, se realiza sin una variación en la expresión de la proteína (Tang et al., 1992).

El núcleo sulfuro-hierro confiere a la IRP una doble función dependiendo de la concentración intracelular de Fe. En condiciones de alta concentración de Fe intracelular, la IRP presenta un núcleo sulfuro-ferroso con una conformación 4Fe-4S, y la proteína presenta una actividad enzimática tipo aconitasa. Por el contrario, en bajo Fe intracelular, el núcleo sulfuro-ferroso se disocia generando apo-IRP, con capacidad de realizar

interacción proteína-ARNm, uniéndose específicamente a una secuencia de 28 nucleótidos no codificantes de los ARNm de las proteínas involucradas en el metabolismo del Fe. Esta secuencia nucleotídica se ha denominado IRE (Iron-Responsive Element) (Haile et al., 1989; Rouault et al., 1989a y 1989b) y presenta una estructura secundaria tipo horquilla, con un tronco de 11 pares de bases con una C no apareada en 5', y un loop de seis nucleótidos, cuya secuencia de consenso corresponde a CAGUGM (Haile et al., 1989; Mascotti et al., 1995). La unión IRP-IRE es una interacción de alta afinidad ($K_d > 20$ pM) (Haile et al., 1989). Al unirse la IRP a un IRE ubicado en la región 5' no codificante del ARNm de la ferritina y/o de la 5-amino-levulínico sintetasa eritroide, se inhibe la unión del complejo de pre-iniciación traduccional 43S, impidiendo su movimiento hacia el codón de inicio (Gray and Hentze, 1994; Goossen et al., 1990), lo que reprime la traducción de estas proteínas involucradas en el almacenaje y utilización de Fe respectivamente. Sin embargo, la captación de Fe es ampliamente regulada por 5 copias de IREs que se ubican en la región 3' no codificante del ARNm del RTf (Leibold and Guo, 1992; Kühn and Hentze, 1992; Haile et al., 1992a), la unión de la IRP a estos IREs estabiliza el ARNm del RTf, aumentando su expresión (Casey et al., 1989).

Henderson y colaboradores (1993) demostraron la existencia de IRP2 (105 kDa), proteína que también presenta actividad de unión a ARNm en roedores, que se diferencia de IRP1, por presentar una inserción de 79 aminoácidos en el dominio 1 que no se encuentra en IRP1 (Samaniego et al., 1994). IRP2 no presenta el núcleo sulfuro-ferroso y su actividad de unión a IREs no es regulada por la concentración intracelular de Fe. Sin

embargo, cuando la concentración de Fe interno aumenta la proteína es degradada. Adicionalmente, IRP2 no presenta actividad tipo aconitasa y su actividad de unión a IRE es menos sensible a inhibición por N-etil maleimida (NEM) (Guo et al., 1995b; Kim et al., 1995).

Regulación de la absorción intestinal y de los niveles corporales de Fe.

Las células intestinales regulan la absorción de Fe según las necesidades del organismo: altos niveles corporales de Fe bloquean y bajos niveles incrementan su absorción intestinal. Nuestro laboratorio ha determinado dos sitios de regulación en el proceso de absorción de Fe intestinal: 1) regulación en la etapa de incorporación (captación) y 2) regulación en la etapa de transferencia al medio basolateral (transporte). La forma en que las células intestinales detectan los niveles de Fe, es acumulándolo mediante endocitosis basolateral de Tf plasmática. Así por ejemplo; se puede visualizar la siguiente secuencia: alto nivel de Fe corporal, mayor saturación de la Tf, interacción Tf-célula y mayor acumulación de Fe en la célula epitelial. Lo anterior produce por mecanismos no conocidos una menor absorción de Fe desde el lumen del intestino y una menor transferencia desde la célula hacia la circulación (Tapia et al., 1996; Núñez et al., 1996). El ciclo RTf-Tf en estas células, no está involucrado en la captación de Fe en la membrana apical, ya que el RTf se encuentra ausente en esta membrana (Levine and Seligman, 1984; Parmeley et al., 1985), sin embargo, el RTf ha sido localizado específicamente en la membrana basolateral del enterocito (Banerjee et al., 1986), en donde facilita la entrada de Fe a la célula desde el plasma por endocitosis (Núñez et al.,

1996). Además, debe considerarse, que aunque en estudios preliminares la Tf había sido descrita en las células del duodeno (Huebers et al., 1983), análisis moleculares no han detectado el ARNm para ella, lo que excluye un origen endógeno para la Tf (Pietrangelo et al., 1992; Peters et al., 1988), por lo que sería importada desde el plasma a través del ciclo RTf-Tf.

Los niveles de Fe corporal son regulados por la absorción intestinal (Brown et al., 1958; Flanagan, 1989). Debe entonces existir un mecanismo de información que comunique el estado de repleción de Fe corporal al intestino, así, la célula intestinal debe "sentir" los depósitos de Fe corporal y sobre la base de tal información procesar el Fe dietario para la absorción (Wright et al., 1989; Wien and Van-Campem, 1991), siendo por lo tanto, los depósitos de Fe corporal, la eritropoyesis y la anemia los principales factores que influyen la cantidad de Fe tomado por el enterocito desde la dieta (Hughes et al., 1992). Dos importantes cambios ocurren durante el procesamiento mucosal de Fe que acompañan a la disminución de los depósitos de Fe corporal, el primero es un aumento en la captación de Fe por el enterocito y el segundo es una disminución radical de la incorporación de Fe en la ferritina mucosal. Estos dos cambios aumentarían el compartimento intercambiable de Fe en la célula mucosal y facilitarían la transferencia de una mayor fracción de Fe dietario al plasma (Topham et al., 1992). Estos antecedentes han sido consistentes con la hipótesis que una disminución de corta duración del Fe produce un efecto estimulante sobre el procesamiento de Fe en la mucosa, equivalente al observado en animales con deficiencia de Fe severa, por lo que

un ajuste en la captación de Fe por la membrana luminal ocurre extremadamente rápido en respuesta a cambios en el contenido de Fe de la dieta (Topham et al., 1992). Estos antecedentes han permitido sugerir que el contenido de Fe dietario previo regula subsecuentes absorciones del metal (Fairweather-Tait and Wright, 1984), y sostienen la hipótesis que existe un marcado efecto local de la exposición diaria a Fe, sugiriéndose que la regulación puede ser ejercida principalmente a través de la supresión de la captación por la mucosa.

Fase de Captación y de Transferencia

La etapa regulada en la captación de Fe es su pasaje a través del epitelio intestinal (Flanagan, 1989). Este paso transcelular es regulado inversamente por los depósitos de Fe intracelular. Esta regulación se demostró en vesículas del borde en ribete de células intestinales deficientes en Fe, las que presentaron una captación de Fe aumentada (Simpson et al., 1985). Nosotros hemos estudiado el efecto de los niveles intracelulares de Fe sobre la velocidad de captación de Fe desde el medio apical. La velocidad de captación disminuye cuando la concentración intracelular de Fe aumenta hasta 0,2 mM. Una concentración mayor a 0,2 mM no produce una mayor disminución de la captación de Fe. Por lo tanto, una mayor fracción de esta capacidad de captación de Fe (~70%) se encuentra regulada por el contenido de Fe de la célula, mientras que un menor porcentaje es insensible a regulación. Claramente, el mecanismo por el cual la célula regula la captación de Fe, está bajo el control de la concentración intracelular de Fe, el cual puede ser correlacionado con los niveles de Fn y con una disminución en la actividad de la IRP1.

Estas respuestas coordinadas sugieren que la absorción de Fe y la actividad IRP se encuentran bajo el control de un regulador común sensible a Fe, que opera en células con una concentración intracelular menor de 200 μM de Fe (Tapia et al., 1996; Arredondo et al., 1997).

El RTf es un miembro de los receptores de la superficie celular que se encuentran constitutivamente recubiertos y que son rápidamente internalizados (Collawn et al., 1990). La estructura primaria del RTf ha sido deducida a partir del cDNA y consta de dos subunidades idénticas de 95 kDa covalentemente unidas por dos puentes disulfuros. Girones y colaboradores (1991), identificaron un subdominio de internalización funcional de aproximadamente 20 aminoácidos presente en el extremo amino-terminal del receptor. Esta región sería suficiente y necesaria para permitir una endocitosis efectiva, eficiente y rápida del RTf y que la señal de internalización YTRF (Collawn et al., 1990) por sí sola, no sería suficiente para determinar la endocitosis del RTf. Complementariamente, se demostró que la tirosina 20 (en el dominio intracelular) tendría un rol directo en la endocitosis del complejo RTf-Tf, formando parte del dominio de reconocimiento que permitiría el proceso de endocitosis (Alvarez et al., 1990). Por lo tanto, la posición relativa de la señal en el tallo citoplasmático, es una característica crítica que distinguiría señales de blanco lisosomal de señales de internalización (White et al., 1998).

En condiciones normales, las células de los vertebrados obtienen su Fe mediante endocitosis del complejo RTf-Tf-Fe (Weinberg, 1989; Crichton and Ward, 1991). La

secuencia de este proceso es: a) unión del complejo RTf - Tf-Fe a su receptor en la membrana celular, b) internalización del complejo RTf-Tf-Fe mediante endocitosis, c) acidificación de la vesícula endocítica (pH 6,0-6,2) mediado por una H⁺-ATPasa y labilización del Fe⁺³ de la Tf. Por otro lado, el RTf asociado a apoTf es reciclado a la superficie celular, donde a pH neutro la afinidad del RTf por apoTf es baja, por lo que la apoTf es liberada a la circulación (De Silva et al., 1996), d) reducción del Fe⁺³ a Fe⁺² por una reductasa dependiente de ascorbato, y e) transporte membranoso del Fe⁺² y paso de éste al citosol (Núñez et al., 1990). Desde este lugar, el hierro es transportado hacia la mitocondria o es almacenado en la ferritina. Las células intestinales tienen abundantes RTf en la membrana basolateral. Nuestro laboratorio demostró, que las células intestinales adquieren considerables cantidades de Fe por medio de endocitosis basolateral de Tf y postulamos que este proceso sería parte del mecanismo por el cual, la célula del epitelio intestinal sentiría la concentración plasmática de Fe (Núñez et al., 1996).

Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1).

El transporte de hierro desde el lumen intestinal hacia el enterocito es el punto de mayor regulación de la absorción intestinal. Este transporte es mediado por el transportador de metales divalentes DMT1 (Gunshin et al., 1997). La secuencia nucleotídica de DMT1 predice una proteína de 561 aminoácidos, con doce segmentos putativos de transmembrana y con los extremos amino y carboxilo terminal ubicados hacia el citoplasma. La proteína se expresa ubicuamente, principalmente en duodeno, riñón (Gunshin et al., 1997). Es probable que su función transportadora de Fe se lleve a

cabo en una gran variedad de tejidos, ya que se ha demostrado que el gen se encuentra ampliamente expresado, en el tracto gastrointestinal (Trinder et al., 2000), hipocampo, corteza y cerebelo (Williams et al., 2000), cerebro (Burdo et al., 2001), riñón (Ferguson et al., 2001; Tchernitchko et al., 2002), médula ósea e hígado (Gunshin et al., 1997; Trinder et al., 2000). La forma dominante de DMT1 expresado en el duodeno es la forma DMT1-IRE (Oates et al., 2000).

En el duodeno de animales deficientes en Fe, la expresión de DMT1 aumenta varias veces, una indicación que DMT1 es regulado por los niveles intracelulares de hierro (Griffiths et al., 2001). Dos ARNm para DMT1 se generan por empalme alternativo, uno con un motivo IRE en la región 3' no traducida (DMT1-IRE) y otro sin motivo IRE (DMT1 no IRE) (Lee et al., 1998; Canonne-Hergaux, 2001; Cazzola and Skoda, 2000). Esto resulta en la activación de la expresión de DMT1-IRE por el sistema IRP/IRE y un aumento en la captación apical de hierro a bajos niveles celulares de hierro y en una actividad basal de transporte independiente de la concentración celular de hierro dado por DMT1 sin IRE. DMT1 fue caracterizado electrofisiológicamente y se describió como un transportador que realiza transporte activo acoplado a protón y depende del potencial de membrana de la célula para su función. En estas condiciones, el transportador presenta un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentra Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , y Pb^{2+} (Gunshin et al., 1997). DMT1 se localiza además, en endosomas tardíos y lisosomas (Fleming et al., 1998; Gruenheid et al., 1999; Andrews et al., 1999), donde DMT1 transferiría el Fe^{+2} libre desde el endosoma al

citoplasma, durante el ciclo intracelular de la transferrina (Gruenheid et al., 1999; Tabushi et al., 2000). Una mutación sin sentido, G185R, genera un transportador DMT1 que es deficiente en el transporte de hierro (Fleming et al., 1998).

La expresión de DMT1 es estimulada por una dieta deficiente en hierro y representa un mediador clave de la absorción de hierro intestinal. DMT1 además de localizarse en la membrana apical de las células de epitelio intestinal, también se encuentra localizado en endosomas tardíos y lisosomas, donde podría transferir el Fe libre del endosoma al citoplasma durante el ciclo intracelular del RTf-Tf (Gruenheid et al., 1999; Tabushi et al., 2000; Fleming et al., 1998).

Hemocromatosis Hereditaria y proteína HFE.

La Hemocromatosis Hereditaria (HH) es una enfermedad autosómica recesiva, ligada al sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) clase I y es uno de los desordenes genéticos más comunes en el hombre (1 a 2 individuos de 400 presentan la patología) (Feder et al., 1996). Su incidencia es mayor que la sumatoria de la fibrosis quística, fenilcetonuria y distrofia muscular (Parkkila et al., 1997a). Se caracteriza por una falla en la regulación de la absorción de Fe, un aumento en la saturación de la Tf y un progresivo depósito de Fe en las células parenquimales de algunos órganos (Santos et al., 1996; Felitti and Beutler, 1999) y toxicidad celular (Fleming and Sly, 2002).

La búsqueda del gen ó los genes involucrados en esta patología se prolongó por

muchos años, incluyendo una posible relación en la expresión anormal de Fn y del RTf que implicasen una mayor retención y/o captación del Fe de la dieta en los individuos afectados (Zheng et al, 1994). Feder y colaboradores (1996), identificaron un gen candidato que codifica la proteína HFE, en el brazo corto del cromosoma 6, que estaría involucrado en el desarrollo de la HH. Sorprendentemente, este gen no codifica para una proteína con características de transportador de metales, sino una proteína del tipo HLA clase I. La región promotora del gen de HFE contiene secuencias homólogas a algunos elementos regulatorios *cis*, incluyendo GATA, NF-IL6, AP1, AP2, CREB, PEA3, γ -IRE, GFI1, HNF-3 β y HFH2 (Sánchez et al., 1998; Fleming and Sly, 2002). La expresión de HFE en cultivos celulares no es inducida en respuesta a algunas citoquinas (Salter-Cit et al., 1999) y no se ha descrito regulación transcripcional por metales en este gen (Fleming and Sly, 2002)

Los seis primeros exones del gen de HFE codifican para: péptido señal de 22 aminoácidos, tres dominios extracelulares (dominios α 1, α 2 y α 3) desde el aminoácido 23 al 293, dominio de transmembrana (residuos 294-316) y un pequeño dominio citoplasmático (aminoácidos 317-343) (Parkkila et al., 1997b), codificando una proteína de 343 aminoácidos. Presenta un puente disulfuro entre los dominios α 2 y α 3, que es clave en la función de la proteína, ya que la proteína HFE interactúa en el retículo endoplásmico con la chaperona β ₂-microglobulina (β ₂M) a través del dominio α 3. Esta interacción es necesaria para la destinación de HFE a la membrana plásmática y se pierde cuando este enlace está ausente (Lebron et al., 1998). Estudios cristalográficos

han demostrado que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ forman un superdominio que incluye dos α -hélices antiparalelas, aunque la hendidura formada por estas α -hélices es análoga al sitio de unión de péptidos en las moléculas HLA clase I, se ha demostrado que HFE no realiza actividad funcional de unión de péptidos antigénicos (Lebron et al., 1998).

Feder y colaboradores (1996), describieron la primera mutación en este gen ancestral, la cual corresponde a un simple cambio de base en el exón 4 del gen de HFE. Esta mutación corresponde a la transición de una G por A en el nucleótido 845 del marco de lectura abierto, lo que resulta en la sustitución de una cisteína por una tirosina en el aminoácido 282 (C282Y) de su secuencia aminoacídica. El 85% de los pacientes con HH son homocigotos en esta mutación e involucra a un residuo altamente conservado que participa en un puente disulfuro intramolecular, que rompe la estructura y función de la proteína. La homología entre HFE y las moléculas HLA clase I, permitió hacer la predicción que HFE se encontraba físicamente asociada con β_2M . HFE-C282Y pierde la capacidad de interactuar con la proteína β_2M y altera el procesamiento y el tráfico intracelular de la proteína HFE y una produce una expresión disminuida en la superficie celular (Waheed et al., 1997). La formación de este complejo ha sido demostrada tanto en duodeno humano (Waheed et al., 1999), placenta (Parkkila et al., 1997a), como en células de cultivo (Feder et al., 1997; Gross et al., 1998). En cultivos celulares, se demostró que la mayor parte de la proteína HFE-C282Y es retenida en el retículo endoplásmico y compartimentos mediales del aparato de Golgi. La proteína no alcanza a completar su procesamiento en el aparato de Golgi tardío y es degradada

rápidamente (Feder et al., 1997; Waheed et al., 1997). Los pacientes con HH presentan una reducida expresión en la superficie celular de la proteína mutante C282Y (Parkkila et al., 2000), lo que confirmó que la asociación entre HFE y β_2M es necesaria para su expresión en la membrana celular y su interacción con el RTf. El significado funcional de la interacción entre la β_2M y la proteína HFE fue estudiado en ratones deficientes en β_2M ($\beta_2m^{-/-}$) (Santos et al., 1996; Levy et al., 1999) y en ratones knock-out para HFE (Zhou et al., 1998), los que presentaron una sobrecarga de Fe similar a la observada en los pacientes con HH.

Una segunda mutación en importancia y más común que la mutación C282Y en la proteína HFE corresponde al cambio de la C 187 por G en el segundo exón, lo que resulta en la sustitución de una histidina por un ácido aspártico en la posición 63 (H63D) de la secuencia aminoacídica, que corresponde al dominio $\alpha 1$. Esta mutación H63D permitiría la formación de un puente salino con un aminoácido del dominio $\alpha 2$ de HFE, debilitando de esta forma la interacción con el RTf y explicaría su efecto sobre el metabolismo del Fe (Waheed et al., 1997; Fleming and Sly, 2002). A diferencia de la proteína HFE-C260Y, HFE-H63D es destinada normalmente hacia la membrana plasmática. La mutación H63D se encuentra en un 15 a 40% de la población caucásica, sin embargo, su presencia como homocigoto es muy baja. Ocho de nueve pacientes con HH que son heterocigotos de C282Y tienen la mutación H63D en el otro alelo (Beutler, 1998). El riesgo de sobrecarga de Fe producido en el heterocigoto C282Y/H63D es aproximadamente 200 veces menor que cuando se encuentra el homocigoto C282Y.

Se han descrito otras mutaciones asociadas a la proteína HFE además de C282Y y H63D en pacientes con sobrecarga de Fe. Estas mutaciones incluyen S65C, G93R, I105T (Barton et al., 1999; Mura et al., 1999). De estas mutaciones, S65C es la más común (7,8% de la población con un fenotipo HH, pero sin las mutaciones H63D ni C282Y). Las mutaciones G93R y I105T se localizan en el dominio $\alpha 1$. En adición a estas mutaciones, se han descrito dos mutaciones que implican un cambio en el marco de lectura (P160 Δ C y V68 Δ T) (Pointon et al., 2000), dos mutaciones sin sentido (Piperno et al., 2000) y una mutación en el sitio de splicing (Wallace et al., 1999).

La relación establecida entre la proteína HFE y el metabolismo del Fe fue dada por la observación que HFE forma un complejo con el RTf (Bennett et al., 2000). La formación de este complejo resulta en una disminución en la unión de la transferrina al RTf (Lebron et al., 1998; Feder et al., 1998). HFE se une al RTf con una afinidad similar que la Tf, compitiendo con ella por el sitio de unión (Roy and Enns, 2000). La estequiometría del complejo HFE-RTf, aun no está completamente clarificada, sin embargo, estudios de interacción entre HFE y RTf en células transfectadas y en solución sugieren una estequiometría de 1:2 (una molécula de HFE por dímero de RTf). Sin embargo, la estructura cristalina indica que una estequiometría de 2:2 es posible en condiciones de altas concentraciones de HFE (Roy and Enns, 2000). La formación de este complejo entre HFE y el RTf produce una disminución en la captación de Fe dependiente de Tf. Sin embargo, ya que la constante de disociación de la Tf por el complejo HFE-RTf es del orden nanomolar (2 – 5 nM) (Lebron et al., 1998; Feder et al.,

1998) y la concentración de Tf plasmática es de aproximadamente 35 μM , se asegura una completa saturación del RTf, aún en presencia de HFE. Sin embargo, esta disminución de la afinidad de RTf por Tf no explica la aumentada absorción intestinal de Fe observada en la HH.

HFE y Tf podrían unirse simultáneamente con el RTf (Lebron and Bjorkman, 1999a) y competirían por su unión al RTf. Para que esto suceda, se requiere la formación de un complejo ternario (HFE:RTf:TfFe = 1:2:1) en donde HFE se uniría a una de las cadenas polipeptídicas del homodímero del RTf y la Tf-Fe se uniría a la otra cadena polipeptídica del RTf. Aunque en presencia de altas concentraciones de HFE, se podría formar el complejo ternario 2:2:2 (Roy and Enns, 2000). La estequiometría para el complejo ternario 1:2:1, implica que la unión de HFE al RTf, produce la internalización de solamente la mitad de Tf-Fe disponible en el medio. Por lo tanto, la concentración relativa en la superficie celular de HFE y RTf y su proximidad espacial en la membrana serán críticos para determinar como HFE afecte la unión de Tf-Fe al RTf bajo condiciones fisiológicas.

Sí HFE y Tf pueden unirse simultáneamente al RTf, sugiere que HFE podría traficar a vesículas endocíticas junto con el complejo RTf-Tf. Una característica de la interacción HFE-RTf es su fuerte dependencia del pH. HFE se une débilmente al RTf en el pH ácido del endosoma (Roy et al., 1999), indicando que la proteína HFE podría disociarse del RTf en las vesículas ácidas intracelulares, quizás para realizar alguna otra

función en la vesícula (Lebron et al, 1998; Drakesmith and Townsend, 2000). Los residuos de histidina son probablemente los aminoácidos candidatos que mediarían las interacciones dependientes de pH, ya que cambian su protonación a pH 6,5. Particularmente, sería importante profundizar sobre la participación del núcleo de histidinas en la proteína HFE (Histidinas 87,89,94 y 123) en la dependencia de pH de la interacción entre HFE y RTf. Puede ser relevante además, que el RTf con la Tf participan en otra interacción dependiente de pH, en donde el RTf une apo-Tf a pH ácido pero no a pH básico (Richardson and Ponka, 1997).

Estudios de inmunolocalización de HFE, muestran que la proteína es expresada en la zona de la cripta del intestino delgado del tracto gastrointestinal (Parkkila et al, 1997a; Waheed et al, 1999). Por inmunolocalización en la superficie de células 293, se observó que la proteína HFE, forma un complejo estable con el RTf. La proteína HFE mutante C260Y, forma solamente trazas de este complejo, permitiendo una unión de la Tf al RTf con alta afinidad (Feder et al., 1998). De igual modo, la mutación H63D presenta una consecuencia funcional similar, alterando en menor grado la afinidad de unión del RTf por TF, sin embargo, no afecta la asociación con la proteína β_2 -microglobulina ó su expresión en la superficie celular (Lebron et al., 1998). La interacción entre HFE, RTf y Fe, sostiene la hipótesis que una perturbación en el sistema RTf-Tf sería un componente en la pérdida de la regulación de la absorción intestinal de Fe (Lebron et al., 1998). La posible interacción HFE/RTf provee un nuevo blanco para agentes

terapéuticos dirigidos hacia la regulación de Fe y/o distribución tisular en desórdenes de sobrecarga de Fe (Feder et al., 1998; Beutler, 1998).

Observaciones recientes de Waheed y cols (2002) indican que la sobreexpresión de HFE en células CHO induce un aumento en la velocidad de externalización de RTf dependiente de la presencia de β 2M, sugiriendo que el efecto del complejo HFE- β 2M en las células CHO reflejaría su rol normal en la célula del epitelio intestinal donde participaría "sensando" el Fe corporal y en la regulación de la absorción de Fe. Los autores sugieren, que en la HH, existe una desregulación de la absorción de Fe, ya que el proceso de captación en las células de la cripta del duodeno es la clave para sensar los niveles de Tf-Fe en los capilares que rodean estas células de la cripta donde la absorción de Fe es controlada. Esta desregulación produce entonces células pobres en Fe, aún en presencia de un exceso de Fe corporal, como sucede en la HH. Este modelo se sostiene además, por la presencia de una aumentada expresión duodenal del transportador apical DMT1 y una aumentada expresión del transportador basolateral de Fe Ireg1 (Ferroportina 1 ó MPT1) (Zoller et al., 1999; 2001).

El receptor para transferrina localizado en la membrana basolateral de las células de la cripta y microvellosidades facilita la entrada de Fe a la célula desde el plasma por internalización de Tf-Fe₂ (Pietrangelo et al., 1992; Núñez et al., 1996). En estados de disminución de los depósitos de Fe, la expresión del RTf depende del nivel de Fe intracelular, mientras que el Fe absorbido por el enterocito es rápidamente entregado al

plasma, la reducción del compartimento intracelular de Fe activa la expresión del RTf con el objeto de restaurar el balance de Fe interno (Pietrangelo et al., 1992). En el modelo en estudio, el número de RTf presentó un comportamiento inverso con respecto a la concentración de Fe interno en las células wtHFE, es decir, presentaron un mayor número de RTf que las células controles y HFE-H63D. Estos resultados apoyan la hipótesis que la expresión del RTf se encuentra aumentada en células con baja concentración de Fe interno (Pietrangelo et al., 1992) y que el número de RTf es regulado inversamente por la concentración de Fe interno (Chan et al., 1994).

Resultados de Fleming y colaboradores (1998) y Oates y colaboradores (2000) indican que la fase de captación de Fe en células de epitelio intestinal es mediada por el transportador DMT1 lo que sugiere fuertemente que DMT1 es el transportador que media la sobrecarga de Fe en la HH. Estudios realizados en ratas knockout para HFE indicaron un fenotipo de sobrecarga de Fe, en tanto que el doble knockout HFE/DMT1 no presentaba sobrecarga de Fe (Griffiths et al., 2001).

Cultivo celular y células tipo epitelio intestinal Caco-2.

Un problema fundamental para llevar a cabo estudios de absorción intestinal de Fe, es la carencia de modelos adecuados. Los estudios en órgano completo sólo permiten evaluar la incorporación de Fe al intestino, incorporación al plasma y al organismo entero (Fairweather-Tait et al, 1985). Sin embargo, este modelo no es adecuado para determinar los detalles moleculares que sustentan este proceso. El uso de la línea celular

Caco-2, como un modelo de estudio de las funciones intestinales (Halleaux and Schneider, 1991; Peterson and Mooseker, 1993a; 1993b), nos ha permitido realizar estudios de captación y transporte transepitelial de Fe, ya que sintetizan las proteínas relacionadas con el metabolismo del Fe, tales como el transportador DMT1 (Gunshin et al., 1997), Fn, RTF (Hamilton et al., 1994) y un sistema IRP/IRE activo (Arredondo et al., 1997). Las células Caco-2, se comportan además, como enterocitos tanto en la regulación del transporte transepitelial (Alvarez-Hernández et al., 1991) como en su capacidad reductiva de Fe^{+3} apical (Núñez et al., 1994). Ofrecen además, ventajas notables respecto al modelo de trozo de intestino, como por ejemplo no presentar la interferencia producida por el tejido intersticial y del tejido muscular presente en el intestino, por lo que el análisis de niveles de Fe intracelular se puede adjudicar inequívocamente a las células responsables de la regulación de la absorción intestinal, es decir de la mucosa intestinal. Más aún, a diferencia del epitelio intestinal, las células en cultivo representan poblaciones homogéneas en edad y contenido de Fe intracelular.

La célula intestinal durante su migración hacia el tope de la vellosidad intestinal se diferencia en una célula absorptiva funcional, proceso que en el humano dura aproximadamente tres días. Si consideramos que la célula emergente trae consigo la mitad del Fe de la célula madre y que si además se encuentra en un estado de disminución general de los depósitos de Fe, la célula captará Fe con mayor avidez que aquella que se encuentran en el tope de la microvellosidad y que ha captado Fe durante este tránsito. Así, las células del tope de la vellosidad (de mayor edad) contienen mayor

Fe que aquellas que se dividen en la cripta (más jóvenes). La célula originaria de la cripta se comporta como una célula con bajo contenido intracelular de Fe, cuya característica es su alta capacidad de absorción de Fe (Conrad and Crosby, 1963). Esta situación la vemos reflejada en la condición experimental de cultivo con bajo Fe externo. Podemos predecir que la célula epitelial que regula la absorción de Fe, tendrá concentraciones internas de Fe menores de 250 μM (Tapia et al., 1996; Arredondo et al., 1997). Esta concentración podría alcanzarse muy luego en su proceso de migración, si los niveles corporales de Fe son altos. Por el contrario, si los niveles corporales de Fe son bajos, la célula originada en la cripta empezará su proceso migratorio con un nivel interno de Fe menor, y tomará más tiempo en disminuir su proceso absorptivo de Fe.

Algunas de las interrogantes que se contestaron en este proyecto fueron: ¿La sobreexpresión de la proteína HFE altera el contenido de Fe intracelular?; ¿La sobreexpresión de HFE altera la captación apical y el transporte transepitelial de Fe y/o la internalización basolateral de Fe unido a Tf?; ¿La sobreexpresión de la proteína HFE modifica su distribución?; ¿La sobreexpresión de HFE modifica la expresión y distribución celular del transportador DMT1 y del RTf?; ¿La sobreexpresión de HFE modifica la captación y transporte transepitelial de Cu?; ¿Existen otras proteínas que interactúan con el complejo HFE-RTf?; ¿Cómo es la actividad del sistema IRP/IRE en células que sobreexpresan HFE?. Similares preguntas fueron abordadas en células que sobreexpresaban HFE conteniendo la mutación H63D.

OBJETIVO GENERAL

Nos planteamos como objetivo general **“Caracterizar los efectos de la sobreexpresión de la proteína HFE en células de epitelio intestinal Caco-2 y sus incidencias en la regulación de la absorción de Fe”**.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La interacción entre HFE y el receptor para transferrina y su relación con la regulación de la absorción intestinal de Fe nos permiten establecer como hipótesis de trabajo que **“La interacción entre HFE con el RTf y otras proteínas que participan en el metabolismo del Fe es parte del mecanismo normal de regulación de la absorción intestinal de Fe. La pérdida de esta interacción, modifica algún aspecto de la función de HFE necesario para esta regulación.”**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.) Caracterizar la captación y el paso transcelular de hierro en células Caco-2 que sobre expresan HFE.

Se estudió el efecto de sobreexpresión de la proteína HFE sobre la captación y transporte transepitelial de Fe y como este proceso se relaciona con la concentración intracelular de Fe en estas células.

2.) Caracterizar a las proteínas que participan en el metabolismo de Fe en células Caco-2 que sobreexpresan la proteína wtHFE.

Se estudiaron las proteínas involucradas directa o indirectamente en la homeostasis de Fe: Receptor para transferrina; Ferritina, IRPs, Transportador de metales divalente (DMT1), contenido de Fe reactivo, β 2-microglobulina.

3.) Determinar la localización subcelular del HFE, DMT1 y RTf en células Caco-2 transfectadas con HFE.

Se determinó si la sobreexpresión de HFE tiene algún efecto sobre la distribución en la membrana e intracelular de HFE, DMT1 y RTf.

4.) Determinar el efecto de péptidos sintéticos correspondientes al dominio α 1 de HFE sobre la interacción HFE-RTf.

Se estudió el efecto de dos péptidos sintéticos que corresponden al dominio de interacción con el RTf sobre la cinética de internalización y externalización del RTf-Tf-Fe en células incubadas con péptidos de HFE (dominio), que interaccionan con RTf.

5.) Identificar otras proteínas que interactúan con HFE y que permitan una explicación del efecto de HFE en la sobre-absorción de Fe en células del epitelio intestinal.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron los siguientes:

Generales: Tris base, buffer fosfato salino (PBS) Dulbecco, ferritina humana, NP-40, Hepes, PMSF, OPDD, Dithiothreitol, transferrina, β -mercaptoetanol, MOPS, desferal, Chelex 100, EDTA-Na, ácido bórico, NaCl, KCl, Na_2HPO_2 , KH_2PO_4 , NaOH, H_2O_2 , H_2SO_4 , HCl, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, glicina, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, glucosa, NaOH, CH_3COOK , CH_3COOH , CHCl_3 , metanol, etanol, tween 20, glicerol, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Tritón X-100, SDS, estándares de peso molecular.

Anticuerpos: Anti HFE humano, anti IRP humano, anti DMT1 humano, anti ferritina humano, anti RTf humano, anti β 2-M, anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano, anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano, anti ferritina humana conjugado con peroxidasa de rábano, anti IgG-FITC, anti IgG-Rodamina, anti IgG-Alexa.

Cultivo Celular: Medio DMEM, medio Iscove's sin Fe, tripsina, fungizona, penicilina, estreptomicina, suero fetal de bovino, aminoácidos no esenciales.

Radioisótopos: ^{59}Fe , ^{55}Fe , alfa- ^{32}P -CTP, ^{64}Cu .

Biología Molecular: Agarosa, Bam HI, ATP, GTP, UTP, inhibidor de ribonucleasa, ARN polimerasa T7, RNAasa T1, heparina sal sódica, RNAasa pancreática libre de DNAasa, acrilamida, bisacrilamida, Bio Gel P200, azul de bromofenol, SDS, persulfato de amonio, lipofectamina, Oligonucleótidos antisentido para DMT1, péptidos sintéticos A y B de HFE, TRIzol.

2.1.2 Equipos

Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Simma 6100, Perkin Elmer; Contador Beta, Beckmann LS 7000; Contador Gamma, Cobra II, Packard; Espectrofotómetro UV-VIS, Perkin Elmer 559; Lector de Placas Sunrise, Tecan (Austria); Medidor Volt-Ohm epitelial, World Precision Instruments; Incubador CO₂-Water Jacketed, Auto Flow, Nuair; MiniGel Bio Rad, Mini Proteans; Trans-blot Bio-Rad; Secador de geles Gel Dryer, Modelo 583, Bio Rad; Imaging Densitometer Model GS 670, Bio Rad; Campana de flujo

laminar, Nuair, NU-201-430; Microscopio de luz Nikon TMS (Japón); Microscopio Confocal Carl Zeiss LSM; Ultracentrífuga Beckman J2-21 (CA, USA); Microcentrífuga refrigerada Mikro 22R, Hettich (Germany).

2.1.3 Materiales de Cultivo

- 1) Insertos bicamerales Transwells, con membrana de policarbonato, tamaño de poro de 0,4 μm , 6,5 mm de diámetro, Costar (3415).
- 2) Botellas plásticas de 40 ml, área de crecimiento 25 cm^2 , Costar (3025).
- 3) Placas de cultivo de 6 pocillos, 35 mm diámetro, Costar (3406).
- 4) Placas de cultivo de 24 pocillos, 16 mm diámetro, Costar (3424)
- 5) Tubos de centrifugas plásticos Costar, 50 ml (3317) y 15 ml (3316).
- 6) Pipetas plásticas desechables Costar, 25 ml (4251), 10 ml (4101), 5 ml (4050), 2 ml (4021), 1 ml (4011).
- 7) Unidades de filtración desechables, tamaño de poro 0,2 μm , Costar, 500 ml (8344) y 1000 ml (8354)
- 8) Botellas de cultivo reutilizables, Shott Duran, 500 ml y 1000 ml.
- 9) Placas de Elisa, Nunc Inc.

2.1.4 Material Biológico

La línea celular Caco-2 de la American Type Culture Collection (# HTB37, Rockville, MD), es derivada originalmente de un cáncer de colon (Fogh et al., 1977), y

semeja un modelo de epitelio intestinal (Pitt et al., 1987; Arturson, 1991). Estas células expresan GLUT-5, un marcador de microvellosidad de intestino delgado que no se encuentra en colon (Mahraoui et al., 1992). Crecen en monocapas celulares altamente polarizadas y pueden ser usadas para transporte vectorial (Audus et al., 1990), presentan inhibición por contacto de la proliferación, forman uniones estrechas con una resistencia transepitelial de 280-320 ohm x cm² y presentan abundantes microvellosidades.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivo celular: Células Caco-2 (American Type Culture Collection HTB37, Rockville, MD) fueron cultivadas en medio Dulbecco modificado (DMEM), suplementado con 10% suero fetal de bovino (SFB) (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), 100.000 UI de penicilina/estreptomicina y 25 mg/ml de fungizona y aminoácidos no esenciales. Estas células pueden cultivarse tanto en botellas como en insertos bicamerales (Costar, Cambridge, MA). Al cultivarse en insertos (membranas microporosas embebidas en insertos microplatos), exponen su polo apical al compartimento superior y el polo basolateral al inferior, permitiendo el estudio de funciones celulares polarizadas y secreción vectorial de proteínas. Se sembraron 2×10^5 células por botella de 25 ml. Se crecieron por 7 días con cambio de medio cada dos a tres días e incubaron a 37°C, 5% CO₂. Durante este periodo las células alcanzan confluencia, obteniéndose $2-3 \times 10^6$ células por botella. Las células fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones.

2.2.2 Obtención de cDNA y transfección de células Caco-2: Se aisló ARN total de células Caco-2 con TRIzol (Gibco). Se obtuvo el cDNA de HFE por transcripción reversa. El cDNA fue amplificado por PCR usando los ciclos: 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 1,5 min. Las muestras se amplificaron por 30 ciclos con los partidores: 5': 5'-GCCAGAGGATCCGAAATGGGCCCGCGAG-3' y 3': 5'-GTCTG-CACTCGAGGTGTCACCTCAGCCTA-3'. Obtuvimos un producto de 1.1 kb, el cual por secuenciación se comprobó que correspondía al marco de lectura abierto

completo que codifica para la proteína HFE. El cDNA-HFE fue clonado en el vector de expresión en mamíferos pcDNA₃. Células Caco-2 crecidas a subconfluencia (50-70% confluencia, 2 a 3 días después de plaqurear) fueron transfectadas con los plasmidios pcDNA₃-HFE (células wtHFE) ó pcDNA₃ (células controles). La transfección fue realizada en presencia de Lipofectamina (Gibco) a una concentración 5 µL/µg de DNA. La mezcla de DNA/Lipofectamina fue retirada después de 36 hrs de incubación a 37 °C. Las células fueron incubadas por 1 día en medio DMEM, 10% SFB y luego cambiado por medio de selección: DMEM, 10% SFB más 800 µg/ml de geneticina (Gibco).

Como una forma de control de la función de la proteína wtHFE realizamos similares estudios con la proteína HFE mutada en H63D (HFE-H63D). Para obtener HFE con la mutación H63D, se utilizó los partidores: H63D+: 5'-CGTGTTCTATGATGATGAGAGTCGC -3' y H63D-: 5'-GCGACTCTCATCATC-ATAGACACG-3'. Se amplificó a partir de pcDNA₃-HFE para obtener dos fragmentos: 1) fragmento 1: HFE5/H395- y 2) fragmento 2: H395+/H715- (CTTTCCCCTC-CCAGCTTGG). El cDNA fue amplificado por PCR usando los siguientes ciclos: 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto y 72 °C por 1,5 minutos. Con este PCR se obtienen dos fragmentos: 230 pb y 320 pb. Se purificó estos fragmentos y se usan como templado para obtener un fragmento de 550 pb que contiene la mutación. Para obtener la secuencia completa se utilizó como partidores HFE y H715. El fragmento completo fue purificado en gel de agarosa 1% y clonado en el vector de expresión pcDNA₃.

2.2.3 Morfología celular: A células Caco-2 controles y que sobrepresan wtHFE y HFE-H63D se les examinó las características morfológicas por medio de microscopía confocal. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos por 7 días en medio de selección. El día del experimento, las células fueron teñidas con 5-(6)-carboxy-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR). La DCFDA es una molécula no fluorescente. Intracelularmente y por la acción de esterasas intracelulares, la molécula de DCFDA es desesterificada a DCF, molécula que es fluorescente y lipofílica y que se distribuye en la membrana plasmática dando una imagen de los contornos de la célula (García et al., 1996). Secciones ópticas de 2 μm desde basolateral hacia apical fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss MP40. Las secciones fueron integradas usando el software del instrumento. Mediciones de diámetro y alto fueron obtenidas directamente desde la pantalla de la computadora. Cien células fueron medidas en cada condición.

2.2.4 Obtención de células Caco-2 con distintas concentraciones de hierro intracelular: Células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron cultivadas por dos pasajes de 7 días cada uno con distintas concentraciones de ^{55}Fe (0,5 a 20,0 μM) como complejo ^{55}Fe -nitrilotriacetato (^{55}Fe -NTA, relación molar 1:2,2) en Medio Iscove, suplementado con SFB bajo en Fe. Al día 14, se preparó extractos celulares y la radioactividad fue contada en un contador beta. Con este procedimiento, el ^{55}Fe radiactivo asociado a la célula refleja el Fe intracelular total (Tapia et al., 1996).

2.2.5 Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP): Se determinó el pool de hierro reactivo en células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D (14,15). Para ello, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos por 7 días en medio de selección. El día del experimento, las células fueron lavadas con buffer MOPS Salino (20 mM MOPS-OH; 150 mM NaCl; 1,8 mM CaCl₂; 5 mM glucosa, pH 7,4) y luego incubadas con Calceína-AM 0,5 μ M (Molecular Probes, Eugene, OR) por 5 minutos a 37 °C. Después de lavar la calceína no internalizada, las células fueron incubadas en una cubeta conteniendo 3 ml de MOPS-salino y 5 μ L de anticuerpo anti-calceína. Después de determinar la fluorescencia basal de la calceína (excitación 488 nm, emisión 517 nm), la fluorescencia del complejo calceína-Fe fue desahogada por la adición del quelante de Fe salicylaldehído isonicotinoyl hydrazone (SIH). El aumento en la fluorescencia obtenido fue directamente proporcional al contenido de Fe reactivo.

2.2.6 Estudios de la proteína IRP:

A) inmunodetección de IRP. Se sintetizó (Bios Chile, SA.) el péptido B de la secuencia de la IRP: NSYGSRRGNDAVMARC, que corresponde a los aminoácidos 707 al 721 (Eisenstein et al., 1993). El péptido, fue acoplado a hemocianina e inyectado (100 μ g) en el nódulo linfático de la pierna trasera de conejo con coadyudante de Freund's completo. El protocolo incluyó dos refuerzos del antígeno en coadyudante de Freund's incompleto, cosecha del antisuero y medición de la respuesta humoral mediante ELISA. Se obtuvo anticuerpos de dos conejos con un título de trabajo de 1/500 en ELISA. La proteína IRP fue detectada por Western blot usando el anticuerpo purificado anti IRP diluido a 0,5 μ g/ml y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa 1/20.000 (Pierce Chem. Co.).

Las bandas de proteínas fueron detectadas por oxidación de luminol (SuperSignal kit, Pierce Chem. Co.) y autoradiografiadas. Las intensidades de las bandas en el autoradiogramas fueron cuantificadas por densitometría usando el software SigmaScan (Jandel Scientific, San Rafael, CA.). El anticuerpo reconoce dos proteínas de un peso molecular aparente de 105 y 98 kDa, que no fue evidente cuando se incubó sin anticuerpo primario o secundario.

B) Actividad de IRP: Ensayo de cambio de banda: En células Caco-2 crecidas como antes, se determinó la actividad de IRP en un ensayo de retardo en gel (Hentze et al., 1989; Leibold and Munro, 1988). Para ello se utilizó el plasmidio pSPT-Fer (donado por Dr. R. Meneghini, Universidad de San Pablo, Brasil). El plasmidio (3.104 pb) lleva inserto una secuencia de 28 pb del IRE de la región 5' no codificante del ARNm de la cadena H de la ferritina humana (Mullner, 1989) gggagccggaaUUCCUGCUUCAACAGUGCUUGGAC-GGAAucccggg, flanqueada por el promotor de la ARN polimerasa T7 y por el sitio de restricción para Bam HI y (Mullner et al., 1989). El DNA plasmidial fue linearizado con Bam HI y en esta condiciones se realizó transcripción *in vitro*. Se preparó una mezcla de ribonucleótidos consistente de 200 μ Ci de alfa-³²P-CTP (800 Ci/mM = 1.3×10^9 dpm/ μ g, DUPONT), ATP, GTP y UTP 10 mM en Tris 10 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0. La mezcla de transcripción consistió de tampón transcripción 10x (Tris-HCl 400 mM pH 7,5, MgCl₂ 60 mM, espermidina-HCl 20 mM, NaCl 50 mM), DTT 5 mM, 1 μ g DNA molde, mezcla de ribonucleótidos 2 mM, 5 unidades de inhibidor de ribonucleasa, 1 unidad de ARN polimerasa T7, H₂O dietilpircarbonato (DEPC) csp 50 μ L. Se mezcló suavemente, centrifugó 1 minuto a 10.000 g e incubó por 1 horas a 37 °C. Luego, se agregó nuevamente

1 unidad de ARN polimerasa T7 e incubó por 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo con 2 μ L de EDTA- Na_2 500 mM en H_2O -DEPC pH 8,0. 1 μ L de reacción equivale a 400 ng de sonda IRE.

Para realizar el ensayo de retardo en gel, se utilizó el método descrito por Leibold y Munro (1988). En breve, se mezcló 2 μ L de solución de transcrito con 4 μ g de proteínas del extracto celular en ausencia o presencia de β -mercaptoetanol 2% e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó 1 unidad de RNAasa T1 para degradar partes no protegidas del transcrito de ARN e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó heparina (5 mg/ml) para desplazar las uniones no específicas de proteínas al ARN, e incubó por otros 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue cargada con tampón de carga 4x (Tris-HCl 30 mM pH 7,5, sacarosa 40%, bromofenol 0.2% y xilencianol 0.2%) en un gel nativo de poliacrilamida al 5% (acrilamida:bisacrilamida, 60:1) en tampón TBE 1x (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), se corrió a 12.5 volts/cms por 2 horas. Luego, el gel se adhirió a papel 3MM y fue secado por 1 hora a 80 °C al vacío, finalmente fue expuesto a una película para autoradiografía (XAR-OMAT Kodak) por una noche a -70 °C.

Las bandas fueron cuantificadas con un Imaging densitometer y analizadas con el programa de Análisis Molecular Quantity One (GS-670 Imaging densitometer, Bio Rad, Laboratories, CA). Las imágenes fueron procesadas con el programa Corel PhotoPaint 8

con el objeto de aumentar el contraste y ajustar el tono de la imagen. El resultado fue expresado como el porcentaje del área que ocupaba la banda en el área total estudiada.

2.2.7 Estudios de captación y transporte de Fe^{+2} y Fe^{+3} : Después de dos pasajes de cultivo en botellas con ^{55}Fe , las células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas por 12 a 14 días en insertos bicamerales de policarbonato de 0,33 cm² (Transwell, Costar) en medio Iscove, 10% SFB bajo en Fe suplementado con diferentes concentraciones de ^{55}Fe . El día del experimento se realizó: *a)* para los estudios con Fe^{+3} las células fueron lavadas con tampón salino (50 mM 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid-Na; 94 mM NaCl; 7,4 KCl; 0,74 MgCl₂; 1,5 CaCl₂; pH 7,2) y luego incubadas a 37 °C por 1 a 60 minutos en tampón salino suplementados con *a)* 5 μM ^{59}Fe como ^{59}Fe -NTA en el lado apical (Alvarez-Hernández et al., 1994) ó *b)* para los estudios con Fe^{+2} , las células fueron lavadas con tampón salino como arriba excepto que el pH del tampón fue ajustado a 6,75 y luego incubadas a 37 °C por 1 a 60 minutos en tampón salino suplementados con $^{59}Fe^{2+}$ en la forma de complejo ^{59}Fe -ascorbato (1:50, mol:mol) en el medio apical. En ambos casos, la captación de Fe fue detenida lavando el inserto 3 veces con PBS suplementado con 1 mM EDTA helado. Este lavado es efectivo en eliminar el ^{59}Fe unido externamente a las células y membrana del inserto. Un extracto celular fue preparado agregando 100 μL de tampón lisis (10 mM HEPES; pH 7,5; 3 mM MgCl₂; 40 mM KCl, 1 mM phenylmetathylsulfonyl fluoride; 10 μg/ml leupeptina; 0,5 μg/ml aprotinina; 0,7 μg/ml pepstatina A; 5%glicerol; 1 mM dithiothreitol; 0,5% Triton X-100). La mezcla fue incubada por 15 minutos en hielo y sedimentada a 10.000 g por 10 minutos. En el sobrenadante se determinó proteínas por el método de Lowry y

colaboradores (1951), la radioactividad del ^{59}Fe en un contador Gamma. La captación de Fe fue expresada como $^{59}\text{Fe}/\text{mg}$ de proteínas de extracto celular.

2.2.8 Estudios de captación y transporte de Fe y Cu en presencia de Oligonucleótidos antisentido de DMT1:

Para comprobar que el transportador DMT1 es el principal transportador de Fe en la célula intestinal, diseñamos oligonucleótidos antisentidos (Tu et al., 1998) de DMT1 con el objeto de inhibir la actividad y/o expresión del transportador DMT1. Se utilizó secuencias intrónicas (Tu et al., 1998) de la secuencia nucleotídica del transportador DMT1 (entre los intrones 7 y 10). Las secuencias utilizadas fueron:

MA1: 5'CCTTTGACCCTCCCATTCTGCTC3';

MA2: 5'GGTAGACTTCCCCATCTGCCAC3';

MA3: 5'GCAATCTTCCCACCTCAGCC3';

TN1: 5'ACATGGTGAAATCCCGTCTCTAC3';

TN2: 5'CACTC-TCTTCCCAACAGCTCTCC3';

TN3: 5'ATATATACTCTTCCCCGGTTCAG3' y

TN4: 5'TACACGCCAATAATCCCAGCTAC3'.

Las células fueron sembradas como antes en un medio conteniendo $5\ \mu\text{M}$ de Fe, en insertos bicamerales a una densidad de 30.000 células/mL. Luego de 11 días de cultivo, las células fueron transfectadas con $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA en presencia en Lipofectamina (Gibco) como se describió anteriormente, con la diferencia que el

tratamiento se repitió por tres días previos al experimento de transporte. El día 14, se realizó los experimentos de flujo con ^{59}Fe o ^{64}Cu .

2.2.9 Estudios de captación apical y transporte apical-basolateral de ^{64}Cu : Se realizó estudios de captación y transporte de Cu con el objeto de verificar el efecto de la sobreexpresión de HFE sobre el transportador de metales DMT1. Para ello, células Caco-2 controles y transfectadas cultivadas como en el punto anterior fueron lavadas con tampón salino y luego incubadas a 37 °C por 1 a 60 minutos en tampón salino suplementados con 5 μM ^{64}Cu como complejo ^{64}Cu -Histidina (1:10 mol:mol) en el lado apical (Arredondo et al., 2000). La captación de Cu fue detenida lavando el inserto 3 veces con PBS suplementado con 1 mM EDTA helado. Se preparó un extracto celular con tampón lisis como se describió anteriormente. En el sobrenadante se determinó proteínas por el método de Lowry, la radioactividad del ^{64}Cu en un contador Beta. La captación de Cu fue expresada como $^{64}\text{Cu}/\text{mg}$ de proteínas de extracto celular.

2.2.10 Estudios de competencia en la captación y transporte de Fe en presencia de Cu: Células Caco-2 control; wtHFE y HFE-H63D cultivadas como en el punto anterior, fueron lavadas con tampón salino y luego incubadas a 37 °C por 1 a 60 minutos en tampón salino suplementados con 5 μM ^{59}Fe como complejo ^{59}Fe -NTA-Ascorbato y 50 μM Cu como Cu-histidina en el lado apical. La captación de ^{59}Fe fue detenida lavando el inserto 3 veces con PBS - 1 mM EDTA helado. Se preparó un extracto celular con tampón lisis como se describió anteriormente. En el sobrenadante se determinó proteínas

por el método de Lowry, la radioactividad del ^{59}Fe en un contador Gamma. La captación de Fe fue expresada como $^{59}\text{Fe}/\text{mg}$ de proteínas de extracto celular.

2.2.11 Anticuerpos e inmunodetección de HFE. Se sintetizó el péptido $\text{NH}_2\text{-QGSRGAMGHYVLAERE-COOH}$, del extremo carboxilo terminal de la proteína HFE (Parkkila et al, 1997a), con el objeto de producir anticuerpos policlonales en conejo. Para ello, el péptido fue acoplado a tiroglobulina (Pierce Chem, Co) utilizando el reactivo EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, Pierce Chem, Co), la mezcla se inyectó en conejos utilizando procedimientos estándares. Después de cuatro inyecciones, se obtuvo suero inmune y el anticuerpo fue purificado por afinidad con el péptido unido a Affigel (BioRad, Carpintería, CA). La proteína HFE fue detectada por Western blot usando el anticuerpo purificado anti HFE diluido a $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa 1/20.000 (Pierce Chem. Co.). Las bandas de proteínas fueron detectadas por oxidación de luminol (SuperSignal kit, Pierce Chem. Co.) y autoradiografía. Las intensidades de las bandas en el autoradiogramas fueron cuantificadas por densitometría usando el software SigmaScan (Jandel Scientific, San Rafael, CA.). El anticuerpo reconoce una proteína de un peso molecular aparente de 47,5 kDa, que no fue evidente cuando se incubo sin anticuerpo primario o secundario.

2.2.12 Anticuerpos e inmunodetección de DMT1. Similarmente, se sintetizó el péptido SKGLLTEEATRGYVK que corresponde al segmento carboxilo terminal de DMT1, con el objeto de producir anticuerpos policlonales contra DMT1. El anticuerpo fue purificado por afinidad con el péptido unido a Affigel (BioRad, Carpintería, CA). La proteína DMT1 fue

detectada por Western blot usando el anticuerpo purificado anti-DMT1 diluido a 0,5 µg/ml. El anticuerpo reconoce una proteína de un peso molecular aparente de 63 kDa. Para determinar especificidad del anticuerpo anti DMT1, se realizaron experimentos de competencia en presencia de péptido inmunógeno de DMT1.

2.2.13 Anticuerpos e inmunodetección de RTf. La densidad de receptores para transferrina se determinó en extractos celulares por Western blot, usando el anticuerpo monoclonal anti RTf OKT9 (Arredondo et al., 1997), usando el kit de quimioluminiscencia descrito anteriormente. El anticuerpo anti RTf detecta una proteína de peso molecular aparente de aproximadamente de 90 kDa.

2.2.14 Determinación de los niveles intracelulares de ferritina. Ferritina intracelular fue determinada utilizando un enzimoimmuno ensayo tipo sándwich (Arredondo et al., 1997). Para ello se utilizó anticuerpo policlonal primario anti-Fn humana (1/10.000) y anticuerpo anti-Fn humana secundario conjugado a peroxidasa (1/20.000) Dako Co. (Carpintería, CA).

2.2.15 Anticuerpos e inmunodetección de β 2-microglobulina. La expresión de la β 2-microglobulina se determinó en extractos celulares de células Caco-2 controles y transfectadas por Western blot, usando una dilución 1/500 de un anticuerpo policlonal anti β 2M, Dako Co. (Carpintería, CA), un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa 1/10.000 (Pierce Chem. Co.) y el kit de quimioluminiscencia descrito anteriormente. El

anticuerpo anti β 2M detecta una proteína de peso molecular aparente de 11,6 kDa aproximadamente, en geles PAGE-SDS 6,5%.

2.2.16 Glicosilación en DMT1: Para determinar el porcentaje de glicosilación del transportador DMT1 se realizó deglicosilación utilizando el kit Enzymatic Deglycosylation Kit (Glyco, Novato, CA). En breve, a extractos celulares (50 μ g) preparados como antes, diluidos en buffer B 5x (fosfato de sodio 250 mM pH 6,0) se les agregó 2 μ L de NANase II y 2 μ L σ -Glicosidasa e incubó por 1 hora a 37° C. Luego se le agregó 10 μ L de agua destilada; 10 μ L de buffer pH (Na_2HPO_4 0,5 M); 2,5 μ L de SDS/ β -mercaptoetanol y se incubaron a 100 °C por 5 minutos y a 4°C por 10 minutos. Finalmente se le agregó 2,5 μ L de NP-40 y 2,0 de PNGasa F y se incubó por 3 horas a 37 °C. La proteína DMT1 fue detectada por Western blot usando el anticuerpo anti-DMT1 (1:1500) y un anticuerpo secundario (1:20000) conjugado a peroxidasa (Pierce Chem. Co.). Las bandas de proteínas fueron detectadas por oxidación de luminol (SuperSignal kit, Pierce Chem. Co.) y autoradiografía.

2.2.17 Localización intracelular de HFE y DMT1 por microscopía confocal: Células Caco-2 controles y que sobrexpresan HFE fueron crecidas sobre cubreobjetos por 7 días en medio de selección. El día del experimento las células fueron lavadas 3 veces con PBS-MC (PBS, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 0,1 mM). Luego fueron Fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS-MC por 15 minutos y posteriormente lavadas 3 veces con PBS-MC. Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS por 10

minutos a temperatura ambiente y luego lavadas 2 veces con PBS-MC, gelatina 0,2%. Las células se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo anti-HFE (1:1000) o anti-DMT1 (1:1500) en PBS-gelatina. Se lavaron 6 veces con PBS-gelatina y luego se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con anticuerpo anti Ig G de conejo conjugada con fluoresceína (para HFE) o anti Ig G de conejo conjugada con Alexa fluor 488 (para DMT1) (1:1000) en PBS-gelatina 0,2%. Finalmente se lavaron 6 veces con PBS-gelatina y luego 1 vez con PBS. Secciones ópticas de 2 μm desde basolateral hacia apical fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss MP40. Las secciones fueron integradas usando el software del instrumento.

2.2.18 Estudios de Biotinilación de wtHFE y DMT1: Células Caco-2 controles, wt-HFE y HFE-H63D fueron crecidas por 14 días en insertos bicamerales de policarbonato de 4,52 cm^2 (Transwell, Costar) en medio DMEM, 10% SFB, penicilina/estreptomicina y fungizona. El día del experimento, los insertos fueron lavados 3 veces con PBS Ca/Mg (CaCl_2 0,5 mM; MgCl_2 1,0 mM) frío por 5 minutos en agitación. Luego se agregó biotina (Sulfato de biotina, Pierce N° 21217) 200 mg/ml en DMSO (500 μL en apical ó 1500 μL en basolateral). Se incubó por 30 minutos a 4° C en agitación, se lavó con PBS Ca/Mg y se agregó nuevamente biotina. Se incubó por 30 minutos adicionales. Las células fueron lavadas nuevamente con PBS Ca/Mg y se bloqueó por 10 minutos con NH_4Cl 50 mM en PBS Ca/Mg y lavó 2 veces con PBS Ca/Mg. Para realizar la lisis, las membranas fueron cortadas de los soportes y colocados en pocillos de 9,6 cm^2 . Se les agregó 1 ml de tampón lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%; Tritón

X-100 1%, PMSF 2 μ M, mezcla de inhibidores de proteasas 1x (Sigma Co. N° P8340)) y se incubó por una hora a 4° C en agitación. La precipitación fue realizada con estreptavidina inmovilizada (Pierce N° 20349). Para ello 60 μ l de estreptavidina (50%) se incubó con 1 ml de tampón de lisis por una hora a 4° C en agitación. Luego se centrifugó a 1.500 rpm por 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 40 μ l de SDS 10%. Esta solución de estreptavidina fue agregada junto con el precipitado a un tubo de 1,5 ml e incubada en agitación a 4° C por una noche. Las muestras fueron centrifugadas por 1 minuto a 1.300 rpm. Al precipitado se le agregó 1 ml de tampón de lisis, se agitó enérgicamente y centrifugó a 1.300 rpm. El precipitado fue lavado 1 vez con tampón TP II (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%; SDS 0,1%), luego 1 vez con TP III (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; BSA 0,2%) y finalmente 1 vez con TP IV (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Al precipitado de estreptavidina se le agregó 30 μ l de tampón de carga 5x y hervido a 100° por 5 minutos. El sobrenadante fue cargado en un gel PAGE-SDS 8%.

2.2.19 Estudios de captación y transporte de Fe-Tf en presencia de péptidos Sintéticos de HFE: Con el objeto de estudiar la interacción entre HFE y RTf, se sintetizaron (BioSynthesis, Inc, CA) los péptidos del dominio α 1 de la proteína HFE (dominio de interacción con RTf). Ambos péptidos incluyen la histidina-63, la cual se encuentra mutada en la proteína HFE-H63D. La secuencia de los péptidos fue: A: NH₂-LSLFEALGYVDDQLFVFDYD **[H]**E-COOH y B: NH₂-D **[H]**ESRRVEPRTPWVSSRIS-SQ-COOH. Para realizar los experimentos, después de dos pasajes de cultivo en botellas

con ^{55}Fe , las células Caco-2 controles y HFE fueron crecidas por 12 a 14 días en insertos bicamerales de policarbonato de $0,33\text{ cm}^2$ (Transwell, Costar) en medio Iscove, 10% SFB bajo en Fe suplementado con diferentes concentraciones de ^{55}Fe . Apo-transferrina fue cargada a saturación con ^{59}Fe (1:2.2 mol:mol) según fue descrito por Núñez y colaboradores (1996). El día del experimento, las células fueron lavadas con tampón salino y luego incubadas con tampón salino, suplementado con diferentes concentraciones de Tf- ^{59}Fe en el lado basolateral (rango $0,065$ a $1,50\ \mu\text{M}$ Tf- ^{59}Fe) y tampón salino en el lado apical. Las células fueron incubadas a $37\ ^\circ\text{C}$ por diferentes periodos de tiempo (1 a 60 minutos) y la captación de Tf- ^{59}Fe fue detenida lavando el inserto 3 veces con PBS suplementado con $1\ \text{mM}$ EDTA helado. Un extracto celular fue preparado agregando $100\ \mu\text{L}$ de tampón lisis. En el sobrenadante se determinó proteínas por el método de Lowry, la radioactividad del ^{59}Fe -Tf en un contador Gamma. La internalización de Fe-Tf fue expresada como pmoles de ^{59}Fe -Tf/mg de proteínas.

2.2.20. Estudios de la vida media de DMT1:

A) RT-PCR Semicuantitativo. Células Caco-2 silvestres y transfectadas con wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas en pocillos de $9,6\ \text{cm}^2$ como antes. Al día 6, fueron incubadas con $5\ \mu\text{g/ml}$ de Actinomicina D (AMD) por diferentes periodos de tiempo (rango 1 a 48 horas). Luego, se purificó ARN con TRIzol (Gibco). El ARN purificado fue precipitado con isopropanol y lavado con etanol 70%. La pureza y rendimiento del ARN total fueron determinadas espectrofotométricamente. Para realizar el RT-PCR se utilizó los partidores: DMT1-429 5'-CCTGTGGGCGATGGTGGA-3' y DMT1-674 5'-

CATATCCAAATGTGAGGG-CC-3'. Se utilizó 1 μL de cDNA para 25 μL de reacción, que consistió de: 1 μL cDNA; 2,5 μL de tampón 10x; 0,75 μL MgCl_2 (50 mM); 0,5 μL dNTPs (10 μM); 0,5 μL partidor 1 (10 μM); 0,5 μL partidor 2 (10 μM) y 0,25 Taq DNA polimerasa (1,25 U/ μL). El programa utilizado fue: 3 min a 94°C, 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1,5 minutos a 72°C, 10 minutos a 72°C, 10 minutos a 4°C. Se detuvo la reacción en los ciclos 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32. Como control se utilizó actina y se usaron los partidores act-5; 5'-GTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTG-3' y Act-3; 5'-GCCAGCCAGGTCCAG-ACGCAGGATGG-3'. Para realizar el RT-PCR de actina, el cDNA fue diluido 1:20 y se utilizó 1 μL en la mezcla reacción. Para realizar el RT-PCR se utilizó el programa de DMT1. Se mezcló 2 μL RT-PCR DMT1; 2 μL RT-PCR actina y 0,5 μL de tampón de carga 10x y finalmente 2 μL de esta mezcla fueron cargadas en un gel de agarosa 1,3%.

B) Northern Blot. Células Caco-2 silvestres y transfectadas con wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas como se describió en el punto anterior. Con las células se purificó ARN total con TRIzol (Gibco) con el objeto de realizar Northern blot con los métodos tradicionales (Sambrook et al., 1989). En breve, 20 μg de ARN de células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fue separado en un gel de agarosa 1,5% denaturante y luego transferidas a una membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech). Luego fue hibridada a una sonda de DMT1 antisentido de ARN-³²P, la cual fue obtenida con los partidores: DMT1-429 5'-CCTGTGGGCGATGGTGGA-3' y DMT1-674 5'-CATATCCAAATGTGA-GGGCC-3'. Además, se estudió el ARN del transportador DMT1 en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ actinomicina D (AMD). Para ello, 50.000 células/ml

células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron sembradas en pocillos de 9,6 cm², al cuarto día en cultivo, las células se incubaron con actinomicina D por diferentes periodos de tiempo (0- 24 horas). En los distintos periodos de tiempo, se purificó ARN total y se realizó Northern blot según fue descrito anteriormente.

2.2.21 Estudios de interacción entre HFE, DMT1 y RTf: Para realizar el estudio de interacción entre DMT1 y HFE hemos utilizado tres metodologías:

1) Doble híbrido: para ello se utilizó el Kit MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech Lab., Palo Alto, CA). En breve, cDNA de HFE y DMT1 fue clonado en: 1) DMT1 y RTf en pGBKT7 y 2) DMT1, RTf, HFE y HFE-H63D en pGADT7. Se utilizó la cepa Y187 (*MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 Δ* , *met^r*, *gal80 Δ* , *URA3::Gall_{UAS}-GAL1_{TATA}-LACZ*), la cual crece en medio YPDA y cuando son transformadas con los respectivos plasmidios crecen en el medio de selección mínimo base Synthetic Dropout (SD) (Clontech) -Trp/-Leu (Clontech). Las levadura Y187 fueron transformadas por el método de acetato de litio con 0,2 μ g/ μ L de los plasmidios pGB-DMT1 o pGB-RTf y pAD-RTf, pAD-HFE, pAD-HFE-H63D o pAD-DMT1. 100 μ L de las levaduras transformadas fueron sembradas en placas SD/agar e incubadas a 30° C hasta por 5 días. En las placas donde se obtuvo crecimiento, se realizó determinación de β -galactosidasa en papel filtro directamente en las colonias de la placa. Las colonias positivas para β -galactosidasa fueron crecidas a 30° C por 16 a 18 hrs en medio líquido SD con el objeto de preparar extractos de proteínas. Con los extractos proteicos se realizó western blot con el objeto de verificar la

presencia de las dos proteínas. Para detectar la proteína codificada por el plasmidio pGB-DMT1 o pGB-RTf se utilizó como anticuerpo primario anti c-Myc y para las proteínas codificada por los plasmidios pAD-RTf, pAD-HFE, pAD-HFE-H63D o pAD-DMT1 se utilizó como anticuerpo primario anti HA. Como anticuerpo secundario se usó anti Ig G de ratón conjugada con peroxidasa.

2) Coimmunoprecipitación de wtHFE y DMT1: Para ello, células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron sembradas en insertos bicamerales (24 mm diámetro) por 14 días con medio DMEM, 10% SFB, con cambio de medio cada dos a tres días. El día del experimento, se agregó ^{35}S (200 μCi /inserto) e incubó las células por 4 horas a 37°C. Luego las células fueron lavadas 2x con PBS-Ca/Mg (PBS; 1,3 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2) 1 mM PMSF. Luego, se preparó un extracto celular con tampón lisis (PBS-Ca/Mg, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, mezcla de inhibidores de proteasas) e se incubó por 1 hr a 4°C en balancín. El extracto fue centrifugado a 14.000 rpm por 5 min a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 550 μL de proteína A-sefarosa (50 μL proteína A-sefarosa en 500 μL de inmunomix [1% SDS, 1% Tritón X-100, 0,5% BSA en PBS 0,5 mM CaCl_2 , 1,0 mM MgCl_2]) e incubó por 2 horas a 4°C. Los extractos fueron centrifugados por 1 min a 14.000 rpm. El sobrenadante fue incubado con anti HFE ó anti DMT1 por 14 horas a 4°C y luego se le agregó 50 μL de proteína A-sefarosa e incubó por 2 horas a 4°C y 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los extractos fueron centrifugados y lavados 2x con inmunomix y 2x con PBS-Ca/Mg, se les agregó 40 μL de tampón de carga 5x, hervidos por 5 minutos y cargados en un gel PAGE-SDS 8%.

3) Sedimentación en gradiente de sacarosa. Se preparó extractos de células controles, wtHFE y HFE-H63D incubando las células con Tris-salino-1 mM EDTA por 15 minutos a 37 °C. Luego las células fueron lavadas con Tris-salino sin EDTA. Se tomó una alícuota de 10 µL para determinación de proteínas y los extractos fueron alícuotados y congelados a -70 °C hasta su procesamiento. Se preparó 2 tipos de gradientes lineales de Sacarosa 5-25%: a) con NaCl (0,5 M) y b) Sin NaCl. Se cargó 1 mg de proteínas de cada extracto y se centrifugó por 14 horas a 100.000 g a 4 °C. Luego se colectó 12 alícuotas de 450 µL y se tomó 25 µL para determinación de proteínas. Las fracciones fueron corridas en geles de PAGE-SDS al 8% y luego transferidas a nitrocelulosa como se describió anteriormente. Finalmente se realizó western blot para HFE y DMT1.

2.2.22 Análisis estadístico: Las variables fueron medidas en triplicado y los experimentos fueron repetidos al menos dos veces. La variabilidad entre los experimentos fue menor a 20%. Anova de una vía fue usado para medir las diferencias en promedios y t-student fue usado para las comparaciones. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

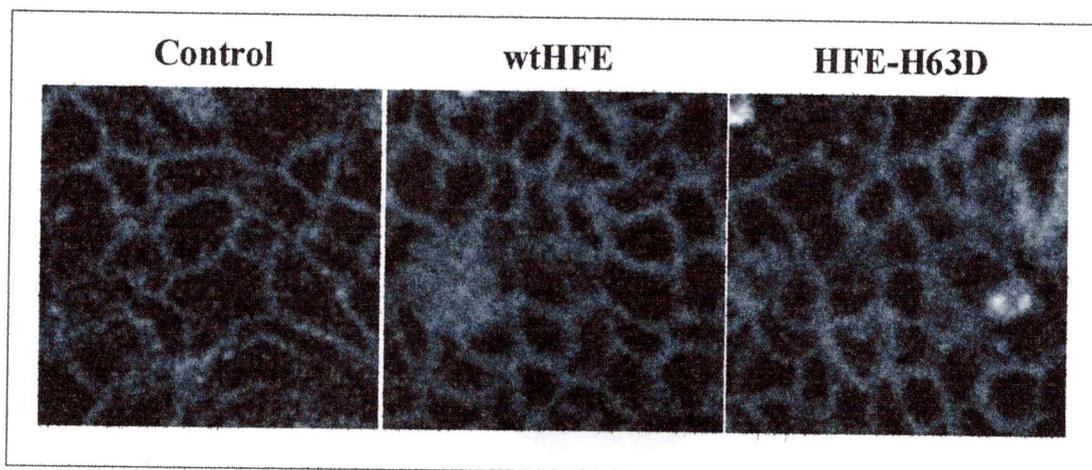
3.1 Morfología celular en células Caco-2 que sobreexpresan HFE: Con el objetivo de determinar si la morfología celular se ve afectada en el modelo utilizado, se estudió por microscopía confocal la morfología de las células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D cultivadas en medio de selección. La figura 1A muestra una imagen del contorno de las células estudiadas, tomada con microscopía confocal, a 12 μm desde la membrana basolateral. No se observaron diferencias morfológicas entre las células controles y transfectadas. Al realizar análisis densitométrico, no se observaron diferencias estadísticas en el diámetro y en la altura de las células (Figura 1B). La altura promedio \pm DE fue de $24,14 \pm 2,11 \mu\text{m}$ y $24,09 \pm 2,04 \mu\text{m}$ y $23,79 \pm 1,26 \mu\text{m}$ para las células controles y wtHFE y HFE-H63D respectivamente. El diámetro en las células controles fue de $10,69 \pm 0,93 \mu\text{m}$, en las células wtHFE fue de $10,18 \pm 0,55 \mu\text{m}$ y de $10,72 \pm 0,85 \mu\text{m}$ en las células HFE-H63D. El análisis densitométrico mostró que las células Caco-2 morfológicamente no son cilíndricas, más bien semejan palitroques, es decir, extremo superior e inferior más delgados que la zona medial.

Figura 1: A) Morfología de células Caco-2 transfectadas con HFE: Células Caco-2 controles y que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas sobre cubreobjetos por 7 días en medio de selección. El día del experimento, las células fueron teñidas con DCFDA, (Molecular Probes, Eugene, OR). Secciones ópticas de 2 μm desde basolateral hacia apical fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss MP40.

B: Análisis densitométrico del eje apical-basolateral y Modelo de las células en estudio. Secciones ópticas de 2 μm desde basolateral hacia apical fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss MP40. Las secciones fueron integradas usando el software del instrumento. Mediciones de diámetro y alto fueron obtenidas directamente desde la pantalla de la

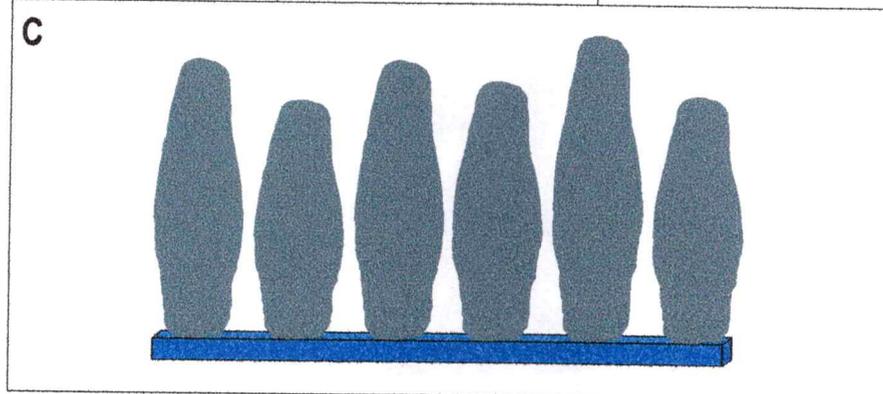
computadora. (n=100 mediciones en cada condición).

C: Modelo de la morfología de las células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D.



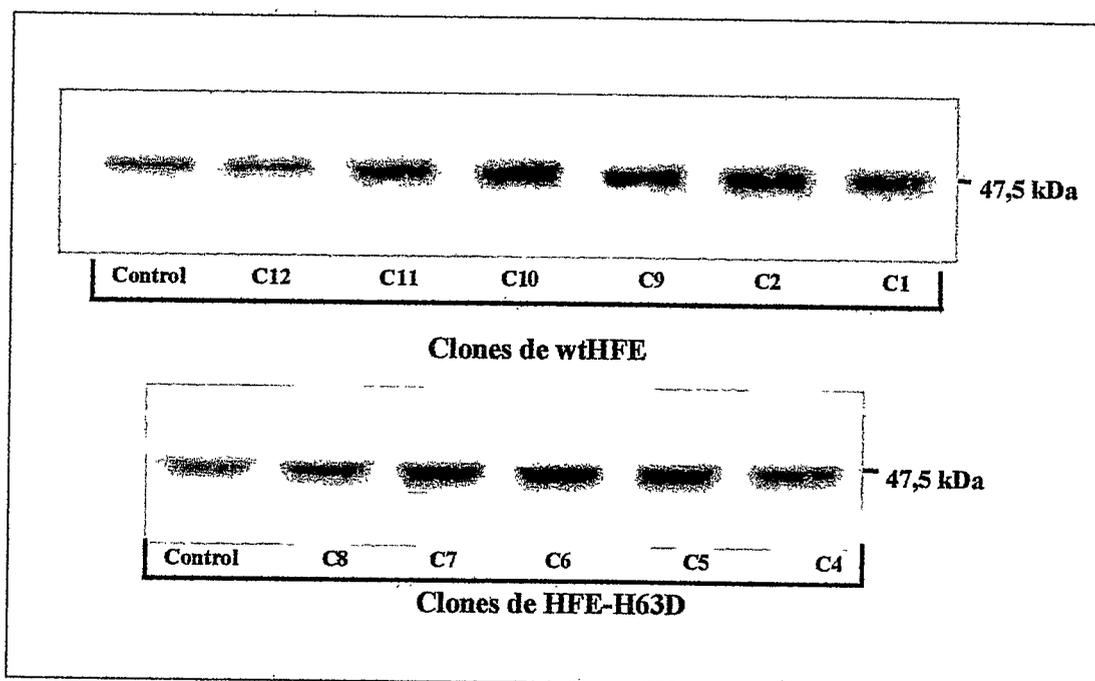
B

	Diámetro (μm)		Altura (μm)	
	X	DE	X	DE
Controles	10,68	0,9	24,14	2,11
wtHFE	10,16	0,5	24,09	2,04
HFE-H63D	10,72	0,8	23,79	1,26
General	10,54	1,7	24,01	1,83



3.2 Expresión de la proteína HFE en células Caco-2 que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D: Con el objetivo de determinar los niveles de la proteína HFE en las células Caco-2, la expresión de la proteína wtHFE fue evaluada en las células controles y en las células wtHFE (6 clones diferentes) y HFE-H63D (5 clones diferentes). Una proteína de un peso molecular aparente de 47,5 kDa fue detectada con el suero anti-HFE (Figura 2). El análisis densitométrico reveló que la masa de HFE en el extracto de células transfectadas con wtHFE y HFE-H63D fue 2 a 3 veces mayor que en las células controles.

Figure 2: Inmunodetección de HFE en células Caco-2 que sobreexpresan HFE. Extractos celulares de células Caco-2 control, wtHFE y HFE-H63D fueron sometidos a inmunodetección por Western blot usando un anticuerpo policlonal contra el C-terminal de HFE.



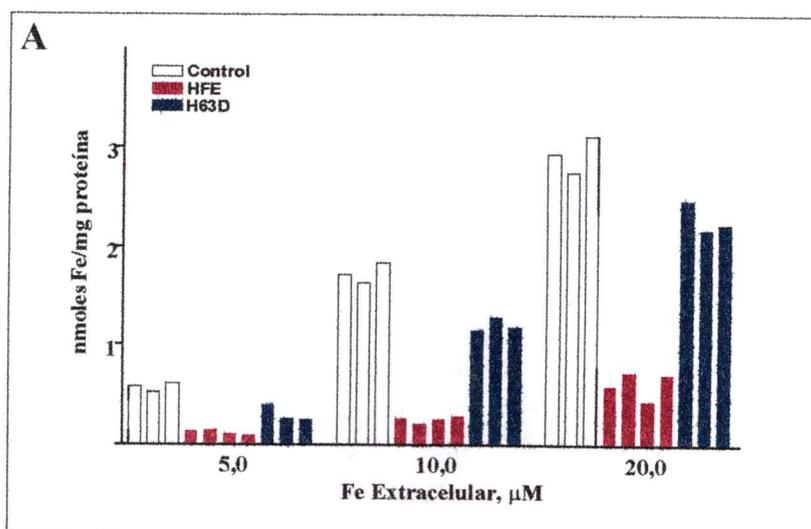
3.3 Contenido intracelular de Fe en células Caco-2 que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D: Ya que el nivel de Fe intracelular es un importante regulador de la absorción de Fe en las células Caco-2 (Alvarez-Hernández et al., 1994; Tapia et al., 1996), determinamos el contenido de Fe intracelular en las células controles y en los diferentes clones de wtHFE y HFE-H63D cultivados por 14 días en botellas y luego 14 días en insertos bicamerales con distintas concentraciones de Fe extracelular. La figura 3A muestra que la concentración intracelular de Fe en los controles aumentó cuando aumentó el Fe en el medio de cultivo. Sin embargo, en los clones de células wtHFE, la concentración intracelular de Fe aumentó levemente, siendo diferente estadísticamente ($p < 0,001$) de las células controles en todas las concentraciones estudiadas. Los clones de células HFE-H63D se comportaron de manera similar a las células controles ($p > 0,05$). La figura 3B muestra los promedios de concentraciones de Fe interno en las distintas concentraciones de Fe estudiado, tanto para las células controles como para los clones de células wtHFE y HFE-H63D. La concentración promedio de Fe intracelular aumentó en las células controles cuando aumentó la concentración de ^{55}Fe en el medio extracelular. La concentración intracelular de ^{55}Fe (nmoles/mg proteínas) aumentó desde $0,191 \pm 0,031$; $0,678 \pm 0,082$; $1,574 \pm 0,197$ y $2,863 \pm 0,287$ cuando el medio extracelular contenía $1 \mu\text{M}$; $5 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ de ^{55}Fe , respectivamente (Figura 3B). Sorprendentemente, los clones de las células HFE tenían una concentración intracelular de ^{55}Fe marcadamente disminuida ($p < 0,001$) en todas las concentraciones de Fe extracelular estudiadas. Las células HFE cultivadas en $1 \mu\text{M}$; $5 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ de ^{55}Fe presentaron un contenido intracelular de ^{55}Fe (nmoles/mg proteínas) de $0,032 \pm 0,043$; $0,115 \pm 0,028$; $0,264 \pm 0,042$ y $0,620 \pm 0,131$,

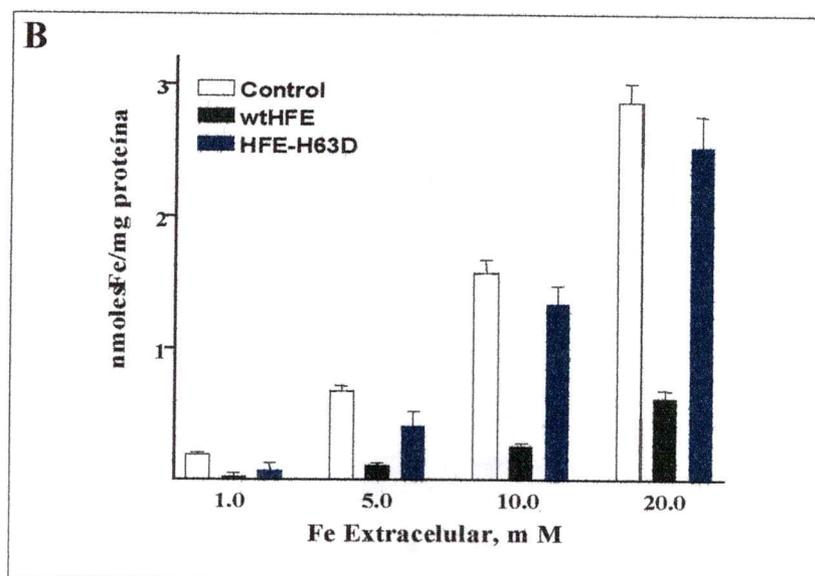
respectivamente. En las células transfectadas con HFE, el contenido de Fe intracelular fue más de 4 veces menor comparado con las células controles transfectadas con el vector pcDNA₃. El contenido intracelular de Fe en las células HFE-H63D fue muy similar a las células controles. El Fe intracelular aumentó desde $0,074 \pm 0,114$; $0,410 \pm 0,220$; $1,342 \pm 0,275$ y $2,525 \pm 0,468$ (nmoles/mg proteínas) cuando el Fe en el medio extracelular aumentó desde 1 μM ; 5 μM ; 10 μM a 20 μM de ^{55}Fe , respectivamente. Desde ahora en adelante, los resultados mostrados corresponden a los obtenidos con los clones wtHFE C2 y HFE-H63D C7.

Figura 3: Contenido intracelular de Fe en células Caco-2 que sobreexpresan wtHFE y HFE-H63D.

A) Fe intracelular individual: Células Caco-2 controles y diferentes clones de wtHFE y HFE-H63D: Las células fueron crecidas en por 14 días en insertos bicamerales con membrana de policarbonato con DMEM, 10% SFB, suplementado con 1, 5, 10 ó 20 μM de ^{55}Fe . Luego la radioactividad del ^{55}Fe determinada en un contador beta. La gráfica muestra los niveles de ^{55}Fe intracelulares como función de las diferentes concentraciones de ^{55}Fe en el medio de cultivo.

B) Contenido intracelular promedio de Fe en las células controles y en los diferentes clones de células wtHFE y HFE-H63D.

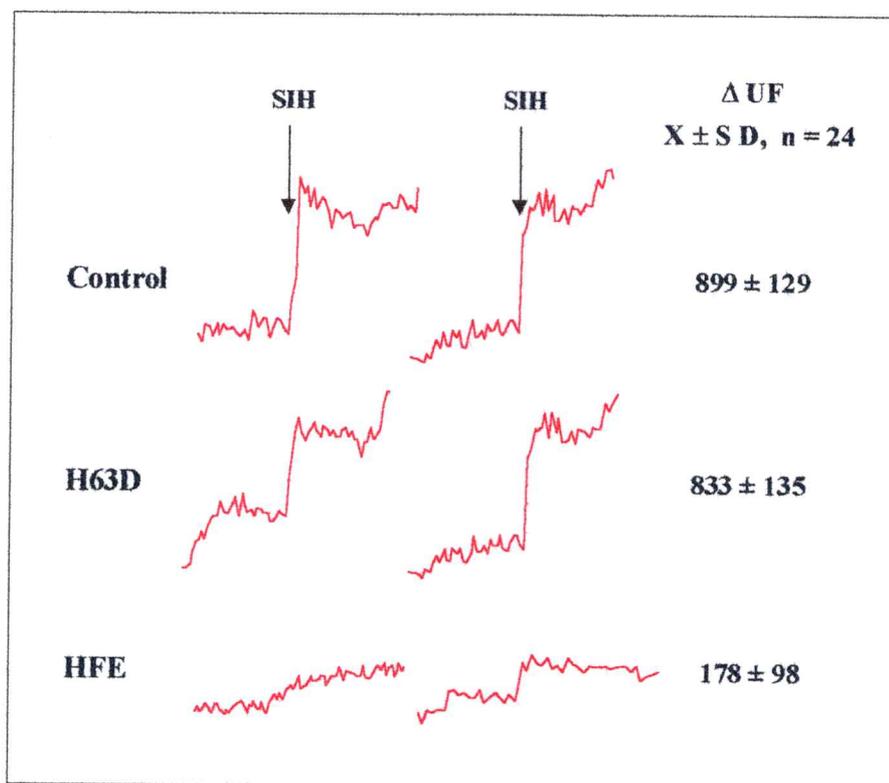




3.4 Determinación del contenido de hierro reactivo (LIP): El contenido de Fe reactivo, se define como el Fe intracelular que se encuentra unido con baja afinidad a componentes celulares, el cual es altamente disponible para las necesidades metabólicas de la célula (proteínas heme, citocromos, enzimas mitocondriales, núcleo sulfuro-ferroso de las proteínas IRP), para almacenaje en ferritina y para transporte al medio basolateral (Meyron-Holtz et al., 1999; Kakhlon et al., 2001). Razonando que la disminución del Fe total intracelular se reflejaría en bajos niveles de contenido de Fe reactivo, se determinó el LIP en las células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D. Las células transfectadas con HFE presentaron un LIP marcadamente reducido (Figura 3). Así, estas células tenían un LIP de 178 ± 78 unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) (promedio \pm DE, $n = 21$). En contraste, las células controles presentaron un LIP de 899 ± 129 UAF (promedio \pm DE, $n = 20$). El LIP en las células HFE-H63D fue de 833 ± 135 UAF (promedio \pm DE, $n = 26$).

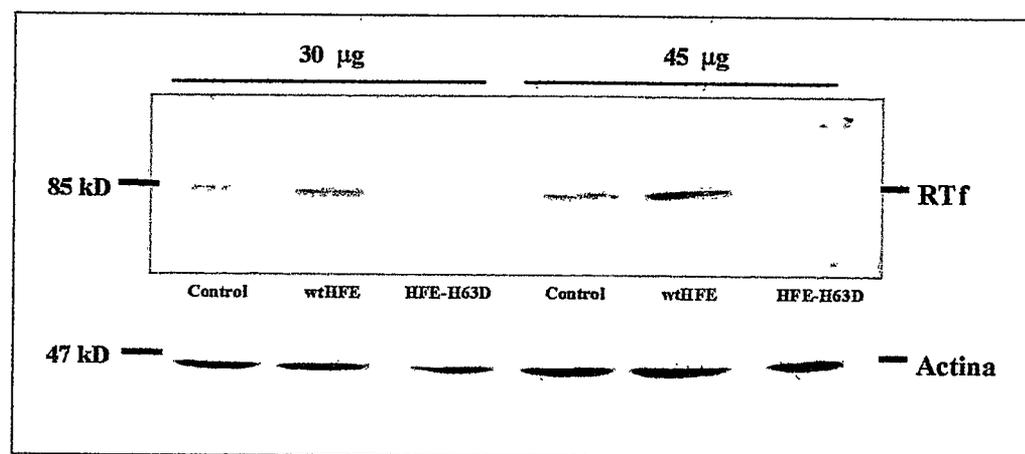
Así, las determinaciones de ^{55}Fe intracelular y de LIP, revelaron que las células que sobrexpresan HFE tienen un pool de Fe intracelular varias veces más pequeño que en las células controles y HFE-H63D.

Figure 4. Determinación del contenido de Fe reactivo (LIP). Células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas en cubreobjetos por 7 días en DMEM, 10 % SFB. El LIP se determinó por medición del apagamiento de Calceína. SIH es un quelador permeable que toma el Fe desde el complejo calceína-Fe aumentando la fluorescencia de la calceína. El nivel del LIP es directamente proporcional al aumento de la fluorescencia de la calceína inducido por el SIH. La figura muestra trazos representativos de fluorescencia de calceína intracelular en las células Caco-2 estudiadas.



3.5 Niveles de Receptor para transferrina y Ferritina: Bajos niveles de Fe intracelular y de LIP deberían activar el sistema IRP/IRE, resultando en niveles aumentados de receptor para transferrina y disminuidos de ferritina (Klausner et al., 1993). De hecho, en monocitos circulantes de pacientes con HH se ha descrito que este sistema tiene mayor actividad que células no HH (Cairo et al., 1997). De acuerdo con esta descripción, se observó que los niveles de RTf se encuentran aumentados en células Caco-2 transfectadas con HFE comparados con las células controles ($p < 0,001$) (Figura 5A). Por densitometría se determinó que la masa del RTf en las células wtHFE fue $4,5 \pm 0,5$ y $5,5 \pm 0,6$ veces mayor que el RTf en las células controles y HFE-H63D, respectivamente.

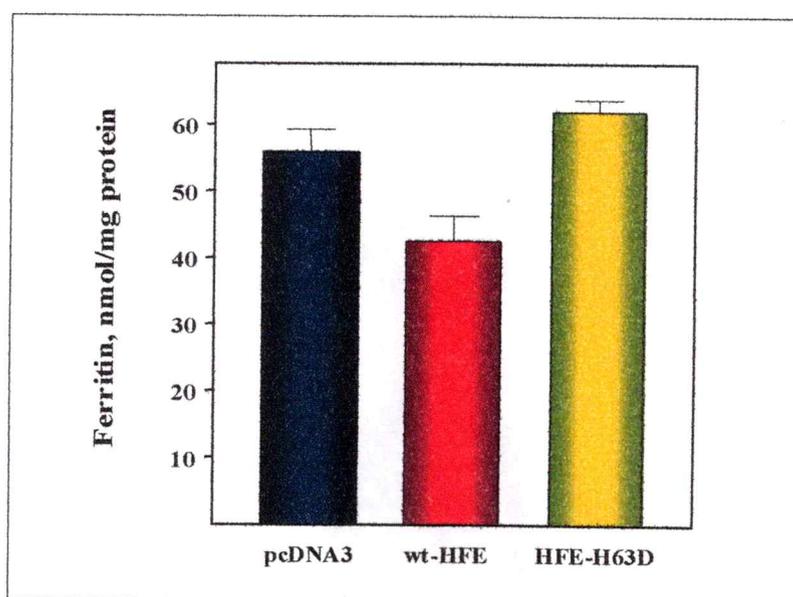
Figura 5A: Receptor para transferrina en células Caco-2 transfectadas con wtHFE: Extractos de proteínas de células Caco-2 control, wtHFE y HFE-H63D, fueron corridos en geles PAGE-SDS 8% e inmunodetectados por western blot para RTf utilizando un anticuerpo monoclonal (OKT9).



Los niveles de ferritina fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en las células HFE comparadas con las células controles (Figura 5B). La concentración intracelular de

Fn en las células HFE fue de 42.3 ± 7.1 nmol/mg proteína versus $55,7 \pm 8.6$ nmol/mg proteína en las células controles. En las células HFE-H63D la concentración intracelular de Fn fue de $62,5 \pm 4,3$ nmol/mg proteína, resultado que no fue diferente estadísticamente de los controles ($p > 0,05$). A pesar de que la diferencia entre los controles y HFE-H63D con wtHFE fue significativa, valores menores de Fn intracelular eran esperados debido a la regulación traduccional del ARNm de la Fn por el sistema IRP/IRE (Klausner et al., 1993), mediada preferentemente por IRP2, por la regulación transcripcional (Tsuji et al., 2000) y por la concentración intracelular de Fe (Gárate and Núñez, 2000). Estos resultados en su conjunto, es decir, mayores niveles del RTf y menores niveles de Fn intracelular nos indicó una mayor actividad del sistema IRP/IRE en las células wtHFE.

Figura 5B. Ferritina intracelular en células Caco-2 transfectadas con HFE: La concentración de ferritina intracelular en células Caco-2 controles, wtHFE o HFE-H63D fue determinada por un ensayo de ELISA. Valores son promedio \pm SD de 6 determinaciones independientes.



3.7 Estudios de la actividad de las proteínas IRP: Ensayo de actividad: Para determinar si este leve aumento en la expresión de las proteínas IRPs en las células que sobrexpresan HFE, estudiamos la actividad de unión de las proteínas IRPs al elemento IRE. Se utilizó el plasmidio pSPT-Fer (3.104 pb) (Figura 7A) el cual lleva inserto una secuencia de 28 pb del IRE de la región 5' no codificante del ARNm de la cadena H de la ferritina humana. La actividad de unión de IRP a IRE se observa en la figura 7B. Las líneas 1 a 7 muestran extractos incubados con la sonda IRE en ausencia de β -mercaptoetanol y las líneas 8 a 14 los mismos extractos incubados en presencia de β -mercaptoetanol. La incubación con β -mercaptoetanol nos da una aproximación de la actividad total obtenida de las proteínas IRP *in vitro*. Al determinar la actividad de unión de las proteínas IRP por medio de ensayos de retardo de movilidad en gel (Figura 7B), se observó que las células wtHFE presentaban un porcentaje de actividad de IRPs mayor ($117,6 \pm 13,3$ %) que las células controles ($96,1 \pm 5,9$ %) ($p < 0,05$) y HFE-H63D ($85,7 \pm 14,7$ %). Esta mayor actividad de IRP en las células wtHFE se correlaciona indirectamente con la concentración intracelular de Fe, Fn y directamente con los niveles de RTf y DMT1 en estas células. Sin embargo, cuando se estudio la razón entre la actividad de IRP/ actividad total (%), se observó que las células wtHFE presentaron la menor razón ($82,1 \pm 9,1$) comparadas con las células controles (100 %) y las células HFE-H63D ($105,9 \pm 10,8$). Este resultado significa que la actividad de unión de IRP al elemento IRE en las células wtHFE se encuentra totalmente activada.

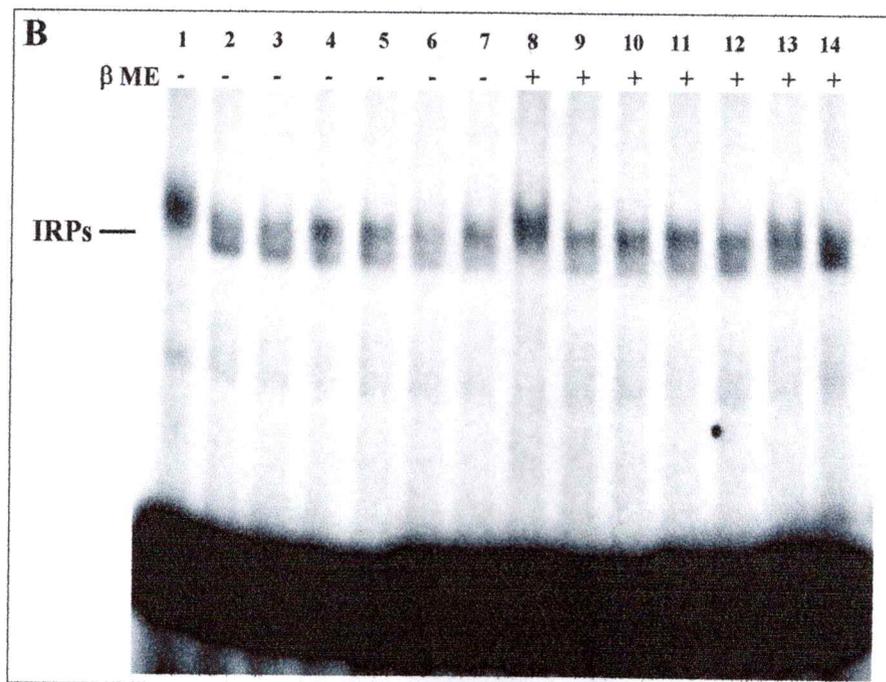
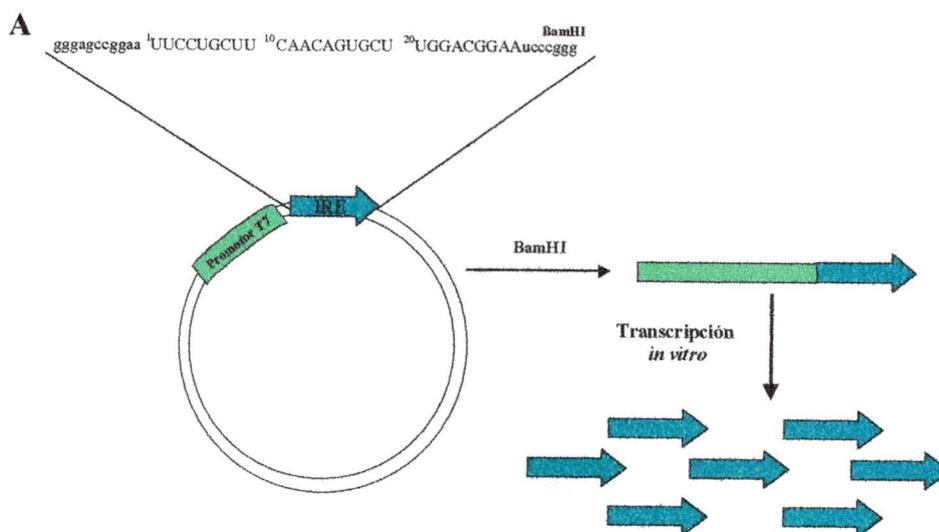
Figura 7: Ensayo de actividad de unión a IRE de las proteínas IRPs:

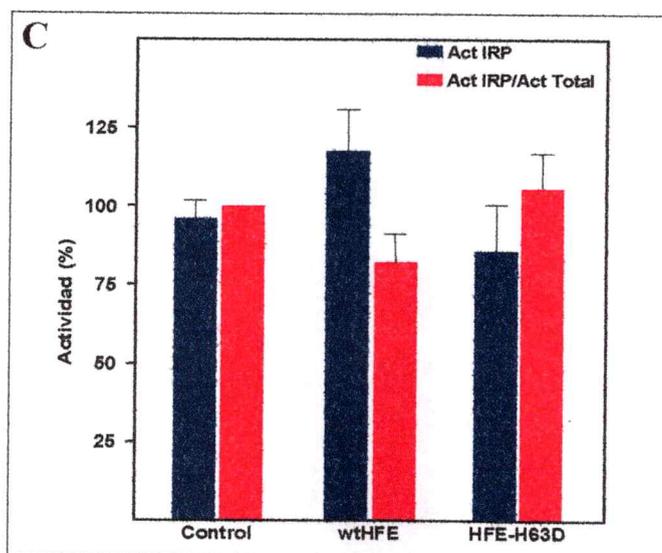
A) Plasmidio pSPT-Fer. El plasmidio pSPT-Fer con la secuencia IRE, fue linearizado con BamHI y se realizó transcripción *in vitro*. 1 μ g de proteínas fue incubados en ausencia o presencia de 2% de β -mercaptoetanol, se mezcló con 2 μ L de transcrito e incubó por 30 min a

temperatura ambiente. Se agregó 1 U de RNAasa T1 e incubó por 10 min a temperatura ambiente.

B) Gel de ensayo de actividad. La mezcla extracto-transcrito fue cargada en gel nativo de poliácridamida 5% (acrilamida:bisacrilamida, 60:1) en TBE 1x. El gel fue transferido a papel 3MM, secado por 1 hr. a 80 °C al vacío y expuesto para autoradiografía (XAR-OMAT Kodak). Líneas: 1 y 8 controles; 2-4 y 9-11 clones de wtHFE; 5-7 y 12-14 clones de HFE-H63D.

C) Análisis densitométrico: Cuantificación por densitometría (n=6) de las bandas de actividad.





3.8 Experimentos de captación y transporte de ^{59}Fe -NTA: La disminución del contenido de Fe intracelular observado en las células transfectadas con HFE podría ser debido a una disminución en la captación del transporte de Fe. Sin embargo, la mayor actividad de IRP de las células wtHFE predecían una mayor expresión del RTf y DMT1, y por lo tanto una mayor captación de Fe por estas células. Similarmente la actividad de IRP de las células HFE-H63D predecían una captación de Fe intermedia, entre las células controles y wtHFE. Así, se determinó la cinética de captación apical y transporte de Fe en estas células. Para ello, las células controles wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas por dos semanas en insertos bicamerales con diferentes concentraciones de ^{55}Fe en el medio de cultivo. El día del experimento, las células fueron lavadas con MOPS-salino e incubadas con $5\ \mu\text{M}$ de ^{59}Fe . En estas condiciones se determinó las cinéticas de captación (apical-célula) y transporte (apical – basolateral) de ^{59}Fe . Como era de esperar en células intestinales controles, que regulan la absorción de Fe, las células controles con baja concentración intracelular de Fe

mostraron altos niveles de captación de ^{59}Fe y células con altos niveles de Fe intracelular, mostraron menores velocidades de captación (Figura 8A, cuadrados rojos). En contraste, la captación de Fe en células wtHFE fue muy baja en las concentraciones de Fe estudiadas comparadas con las células controles ($p < 0,001$) y no mostró diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$) (Figura 8A, círculos amarillos). Las células HFE-H63D tuvieron un comportamiento muy similar a las células controles (Figura 8A, cuadrados azules). Al graficar las velocidades de transporte desde apical hacia basolateral de ^{59}Fe como función de la concentración intracelular de ^{55}Fe se observa la típica curva de decaimiento para las células controles (Tapia et al., 1996) y HFE-H63D (Figura 8B, cuadrados rojos y azules respectivamente), mientras que el transporte apical de ^{59}Fe en las células HFE fue considerablemente más bajo que la cinética en las células controles ($p < 0,05$) y no fueron diferentes entre ellas ($p > 0,05$) (Figura 6C, círculos amarillos).

Al graficar el curso temporal de la captación apical de Fe, se observa que la captación en las células wtHFE fue significativamente menor ($p < 0,001$) comparada con las células controles y HFE-H63D (Figura 8C). El curso temporal de transporte apical – basolateral en las células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D se observan en la Figura 8D. El transporte apical – basolateral fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$) entre las células controles y HFE-H63D con las células HFE. Si observamos los valores veremos que la mayor parte del Fe captado por las células wtHFE fue transportado hacia el lado basolateral.

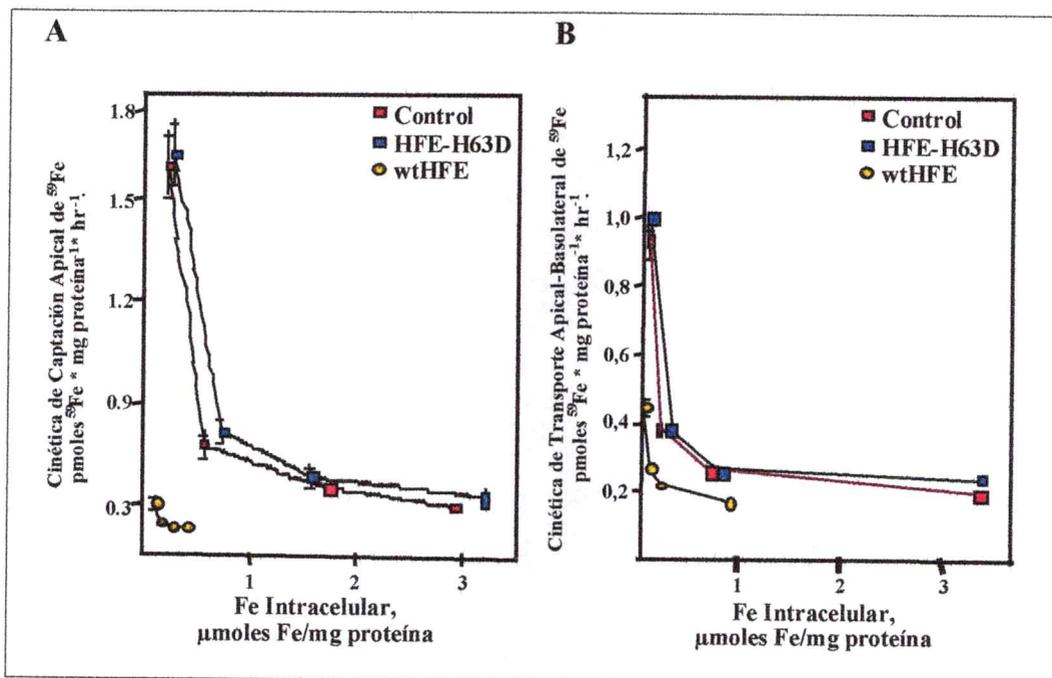
Figura 8. Cinéticas de Captación apical y transporte apical-basolateral de ^{59}Fe por células Caco-2 transfectadas con HFE. Células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas en insertos bicamerales en DMEM, 10% SFB, suplementado con ^{55}Fe (0.5 - 20 μM). Las células fueron incubadas a 37°C por 1 a 60 minutos con 5 μM $^{59}\text{FeCl}_3$ como complejo ^{59}Fe -NTA (1:2.2) por el lado apical del inserto.

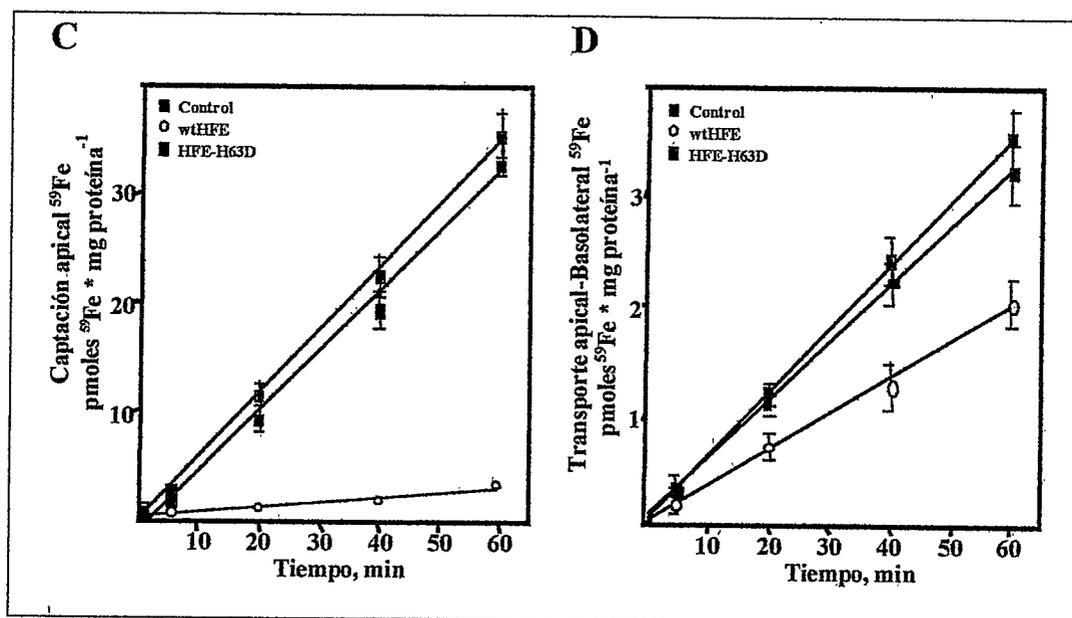
A). Cinética de captación apical de ^{59}Fe en células Caco-2 que sobreexpresan HFE. La gráfica muestra las cinéticas de captación apical de ^{59}Fe como función de la concentración intracelular de Fe.

B) Cinética de transporte apical-basolateral de ^{59}Fe en células Caco-2 que sobreexpresan HFE. La gráfica muestra las cinéticas de transporte apical-basolateral de ^{59}Fe como función de la concentración intracelular de Fe. Células Caco-2 controles (cuadrados rojos), wtHFE (círculos amarillos) y HFE-H63D (cuadrados azules).

C) Curso temporal de captación apical de ^{59}Fe .

D) Curso temporal de transporte apical-basolateral de ^{59}Fe .





3.9 Experimentos de captación y transporte de ^{59}Fe -ascorbato: Como se observó en el capítulo anterior, la captación apical y el transporte apical-basolateral de Fe se encontraba disminuido en las células HFE. Una posible explicación para este resultado podría ser una actividad disminuida de la reductasa de la membrana apical del enterocito. Por lo tanto, para descartar esta posibilidad, realizamos estudios de captación y transporte de ^{59}Fe en el estado reducido +2. Para ello, las células controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas por dos semanas en insertos bicamerales con diferentes concentraciones de ^{55}Fe en el medio de cultivo. El día del experimento, las células fueron lavadas con MOPS-salino e incubadas con 5 μM de ^{59}Fe -ascorbato con el objeto de mantener el Fe en su forma reducida. A modo de comparación, la figura 9A, muestra como es la captación apical de Fe^{+2} (Fe-ascorbato) y Fe^{+3} (Fe-NTA) y Fe^{+3} (Fe-citrato). Se observa que al mantener el Fe en su forma reducida, la disponibilidad de Fe para el transportador aumenta y por lo tanto,

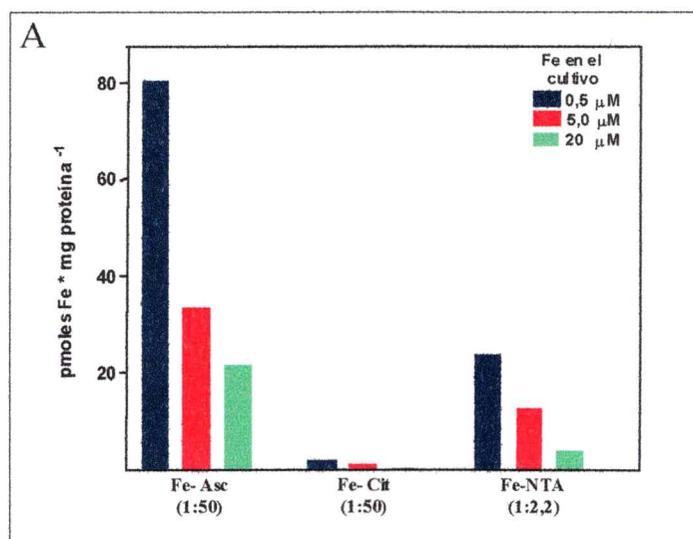
la captación apical de Fe se incrementa en un factor de aproximadamente 3 veces en estas células. Sin embargo, cuando el Fe es mantenido en su forma oxidada, (Fe-citrato) la disponibilidad del Fe para su transporte se ve muy reducida y por lo tanto la captación apical también disminuye. La figura 9B muestra la cinética de captación apical y la figura 9C el curso temporal de captación apical de Fe. Similarmente a los resultados obtenidos con Fe^{+3} -NTA y a pesar que los valores de captación apical en las células wtHFE aumentaron por efecto de la disponibilidad de Fe^{+2} , la captación siempre fue menor en las células HFE que en las células controles y HFE-H63D.

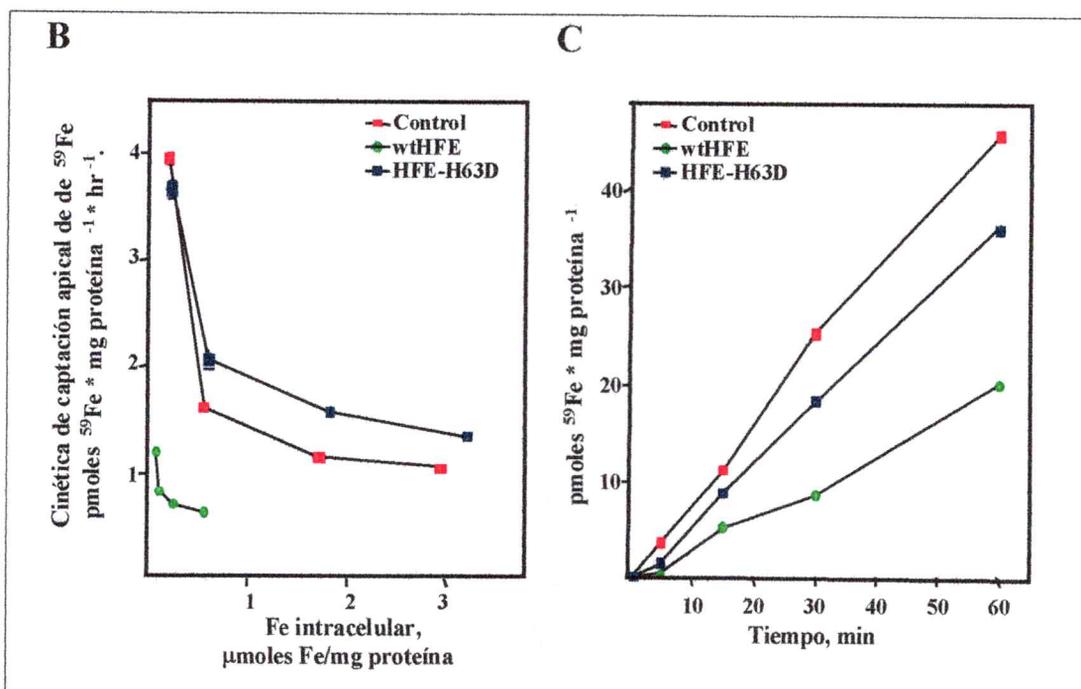
Figura 9. Cinética de Captación apical y curso temporal de captación apical de $^{59}\text{Fe}^{+2}$ por células Caco-2 transfectadas con HFE. Células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas en insertos bicamerales en DMEM, 10% SFB, suplementado con ^{59}Fe (0.5 - 20 μM). Las células fueron incubadas a 37°C por 1 a 60 minutos con 5 μM $^{59}\text{FeCl}_3$ como complejo ^{59}Fe -ascorbato (1:50) por el lado apical del inserto.

A) Comparación de la captación apical de Fe^{+2} y Fe^{+3} en células Caco-2 controles.

B) Cinética de captación apical de $^{59}\text{Fe}^{+2}$ en células Caco-2 que sobreexpresan HFE. La gráfica muestra las cinéticas de captación apical de ^{59}Fe como función de la concentración intracelular de Fe.

C) Curso temporal de captación apical de ^{59}Fe en células incubadas con 5 μM de Fe en el medio de cultivo.



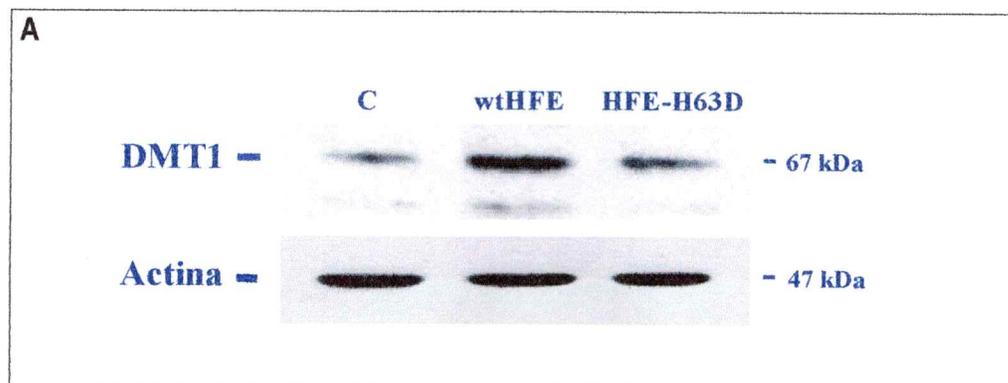


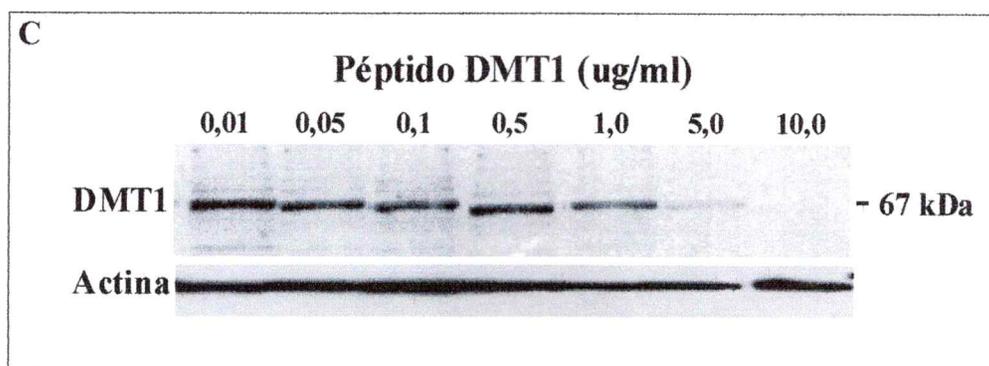
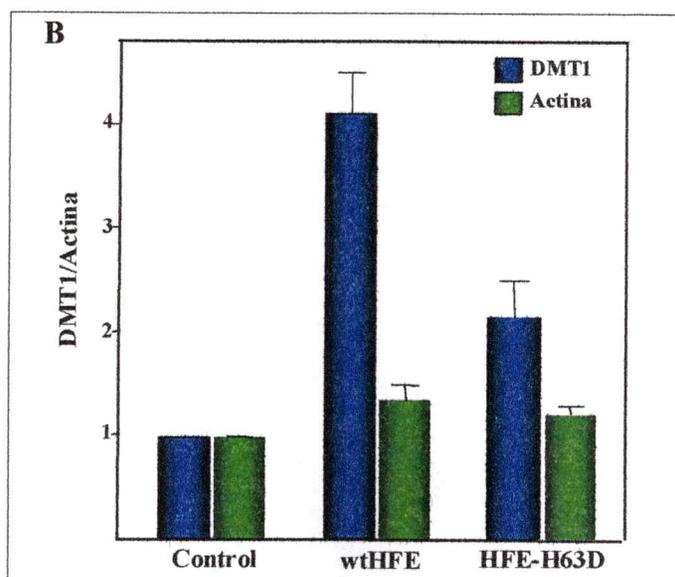
3.10 Niveles del transportador DMT1: La captación apical de Fe por las células intestinales es mediada por el transportador de membrana DMT1 (Andrews, 2000). Por splicing alternativo de DMT1, se produce un DMT1 sin motivo IRE y un DMT1 con motivo IRE en el extremo no traducido 3' de su ARNm (Lee et al., 1998). La captación apical de Fe podría ser consecuencia de una expresión disminuida o una actividad disminuida de DMT1. Al determinar la expresión de la proteína por análisis de Western blot, se observó un aumento de 4 veces en la masa de DMT1 en las células que sobrexpresan wtHFE y 2 veces en las células HFE-H63D al compararlas con las células controles (Figura 10A y 10B). El aumento en la masa de DMT1 es predecible en las células HFE debido a los bajos niveles de Fe intracelular y LIP y a la elevada actividad del sistema IRP/IRE. Esta observación descarta la posibilidad que una disminuida captación apical de

Fe en las células que sobreexpresan HFE sea originada por una disminución en la expresión de DMT1 y sugiere fuertemente que HFE regula en una forma negativa la actividad de DMT1.

Para comprobar la especificidad del anticuerpo anti DMT1, se preincubó el anticuerpo anti DMT1 con el péptido de DMT1 utilizado para producir el anticuerpo. Observamos que este es específico para DMT1 ya que la banda de 67 kDa desaparece. (Figura 10C).

Figura 10. Inmunodetección de DMT1 en células Caco-2 que sobreexpresan HFE: **A) Inmunodetección de DMT1:** Extractos celulares (40 μ g protein) de células Caco-2 controles o HFE fueron sometidas a inmunodetección DMT1 por Western blot usando un anticuerpo policlonal contra el segmento C-terminal DMT1, isoforma IRE. Como control de carga, las membranas fueron lavadas en condiciones de alta fuerza iónica y reprobadas con anti actina. **B) Análisis densitométrico de las inmunodetecciones de DMT1** (n = 4). **C) Estudios de especificidad del anticuerpo anti DMT1:** Competencia con el péptido de DMT1.

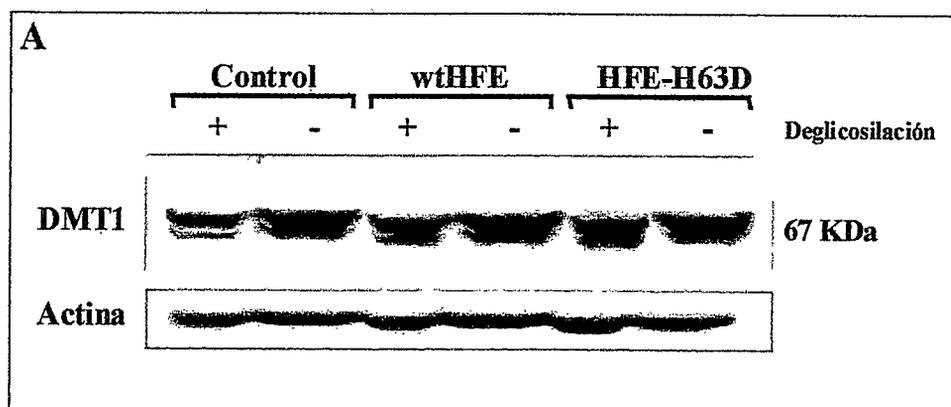




3.11 Estudios de deglicosilación de DMT1: confirmación de la masa molecular de DMT1: Al realizar el western blot de DMT1 determinamos que esta proteína tiene una peso molecular aparente de 67 kDa con una banda menor de 65 kDa. Para determinar si el grado de glicosilación de DMT1 producía un cambio en su migración electroforética, realizamos estudios de deglicosilación (Figura 11A). Se observó un leve cambio en la

migración de DMT1 de 2 a 3 kDa, lo cual está de acuerdo con los dos posibles sitios de glicosilación presentes en el transportador deducidos de su secuencia peptídica. Similarmente, la actina mostró un leve cambio en la migración (1-2 kDa).

Figura 11: Estudio de deglicosilación: Confirmación de la masa molecular de DMT1. Extractos celulares (50 µg protein) de células Caco-2 controles, wtHFE o HFE-H63D fueron sometidas a deglicosilación utilizando las siguientes enzimas: NANase II; O-Glycosidasa y PNGasa F. (kit Enzymatic Deglycosylation Kit; Glyco, Novato, CA) e inmunodetección de DMT1 por Western blot usando un anticuerpo policlonal contra el segmento C-terminal DMT1, isoforma IRE. Como control de carga, las membranas fueron lavadas en condiciones de alta fuerza salina y reprobadas con anti actina. B) Gel PAGE-SDS de extractos sometidos a deglicosilación: Tinción Comasie blue



3.12 Estudios de la vida media del transportador DMT1. Con el objetivo de determinar si el aumento en la masa del transportador DMT1 por efecto de la sobreexpresión de la proteína HFE era debido a un cambio en los niveles del transcrito del transportador DMT1, se analizaron los niveles de ARNm por RT-PCR semicuantitativo y Northern blot. En la figura 12A, se observa un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio representativo de los productos de PCR obtenidos. Al realizar densitometría de las bandas (n=4) (Figura 12B), se observó un aumento en el ARNm de DMT1 en las células wtHFE y HFE-H63D con respecto al ARNm de las células controles ($p < 0,05$), similar al efecto observado con la proteína de DMT1, aunque de menor magnitud.

La figura 12C, muestra un Northern blot de ARN de DMT1 obtenido de células controles, wtHFE y HFE-H63D. Claramente se observa una mayor masa del ARN del transportador DMT1 en las células wtHFE y HFE-H63D. Al realizar análisis densitométrico y corrigiendo por actina, el incremento en la masa del ARN de DMT1 en las células wtHFE y HFE-H63D fue de 2,7 y 1,9 veces, respectivamente. Al incubar las células con actinomicina D y realizar Northern blot para DMT1, se observó que la masa de ARN de células wtHFE y HFE-H63D fue mayor que la de las células controles (figuras 12D y 12E). Este resultado confirma el resultado anterior y por lo tanto, la sobreexpresión de HFE produce un aumento tanto del ARNm como de la proteína de DMT1.

Figura 12: Estudio de la vida media del ARN mensajero de DMT1:

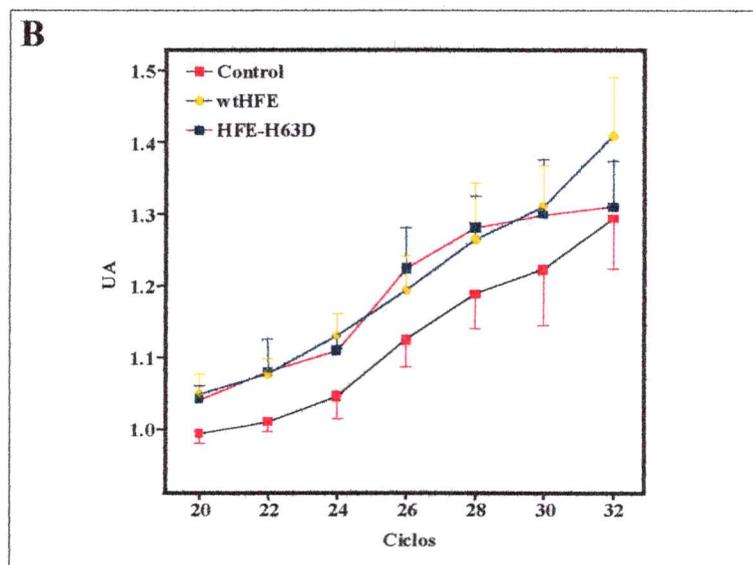
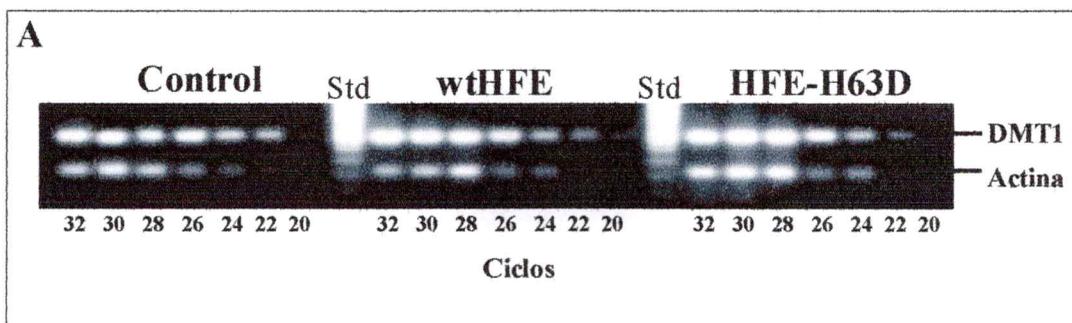
A) RT-PCR en células controles, wtHFE, HFE-H63D. Células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas en placas de 6 pocillos por 4 días en DMEM, 10% SFB, 5 μ M Fe. El día del experimento, las células fueron lavadas con tampón salino e incubadas con actinomicina D (5 μ g/ml) por diferentes periodos de tiempo (0-24 h).

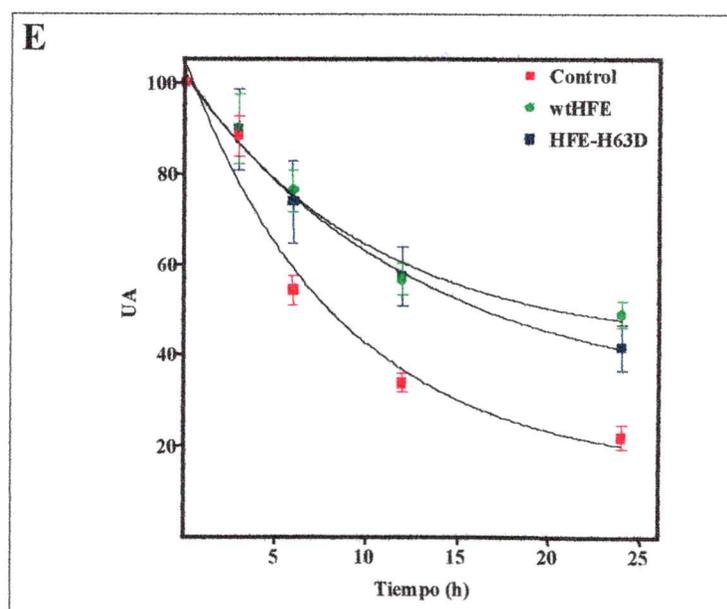
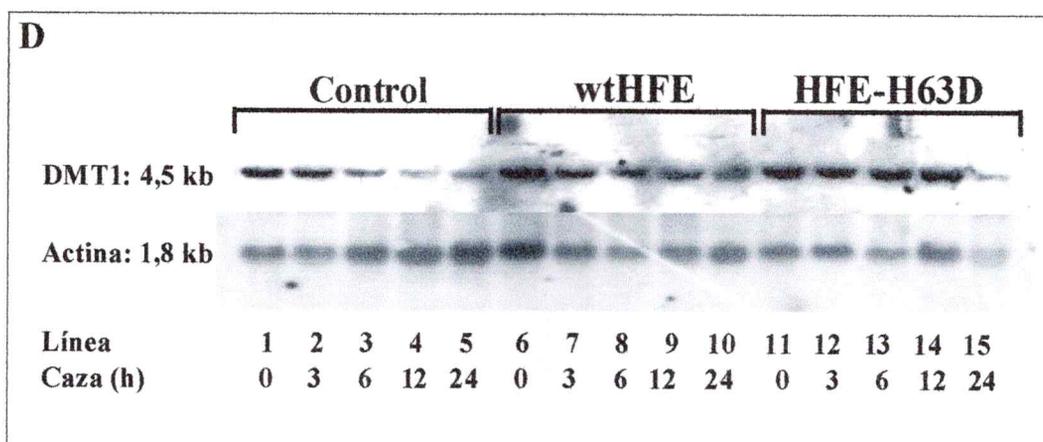
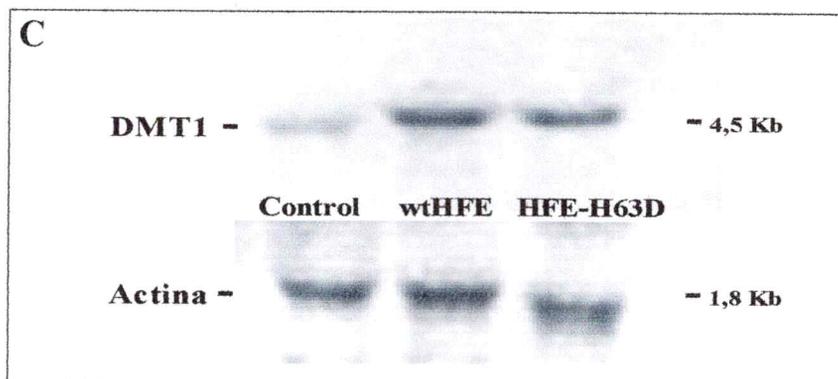
B) Análisis densitométrico (n = 4) de geles de RT-PCR.

C) Análisis de ARN por Northern blot utilizando una sonda de DMT1-³²P. Cada pocillo fue cargado con 20 μ g de ARN total.

D) Análisis de ARN por Northern blot de células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D utilizando una sonda de DMT1-³²P en presencia de actinomicina D (5 μ g/ml).

E) Análisis densitométrico (n = 2) de Northern blot de DMT1.





3.13 Estudios de captación y transporte de Fe y Cu en presencia de Oligonucleótidos antisentido de DMT1: Para comprobar que la captación de Fe por parte del enterocito es un proceso mediado por el transportador DMT1, se realizaron experimentos de captación de Fe en presencia de oligonucleótidos antisentido de DMT1. Como se observa en la figura 13A, obtuvimos tres tipos de respuesta con los oligonucleótidos antisentidos para DMT1. Un primer grupo compuesto por el oligonucleótido MA2 el cual no produjo inhibición en la captación de ^{59}Fe (91% de la captación con respecto del control). Un segundo grupo compuesto por MA3, TN1, TN2, TN3 y TN4 en los cuales se observó una inhibición intermedia (entre un 76 y 62% de la captación respecto del control) y el antisentido MA1 (círculos amarillos), el cual produjo la mayor inhibición en la captación de Fe (18% de la captación con respecto al control).

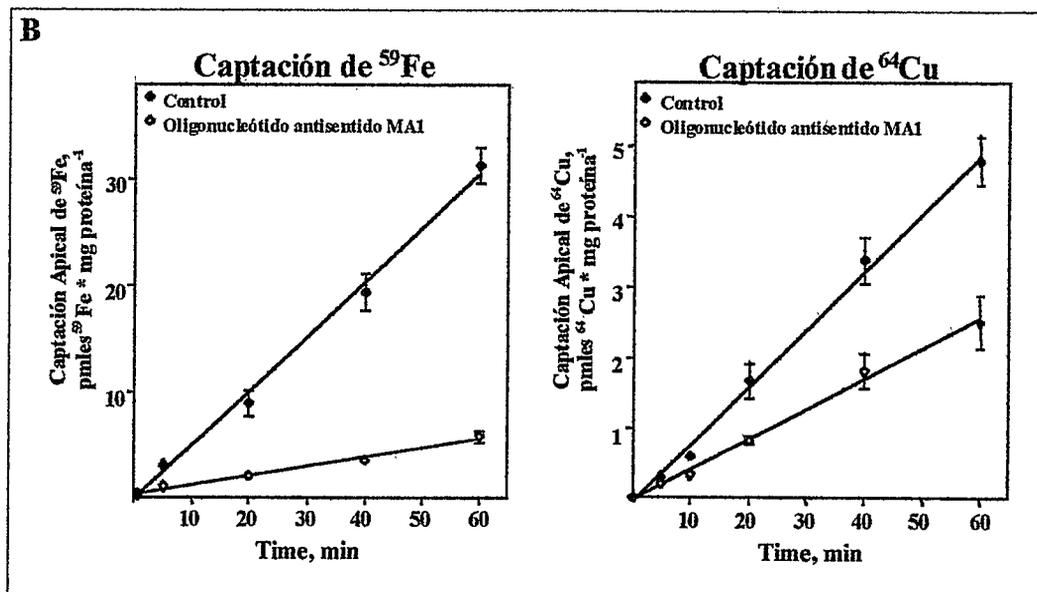
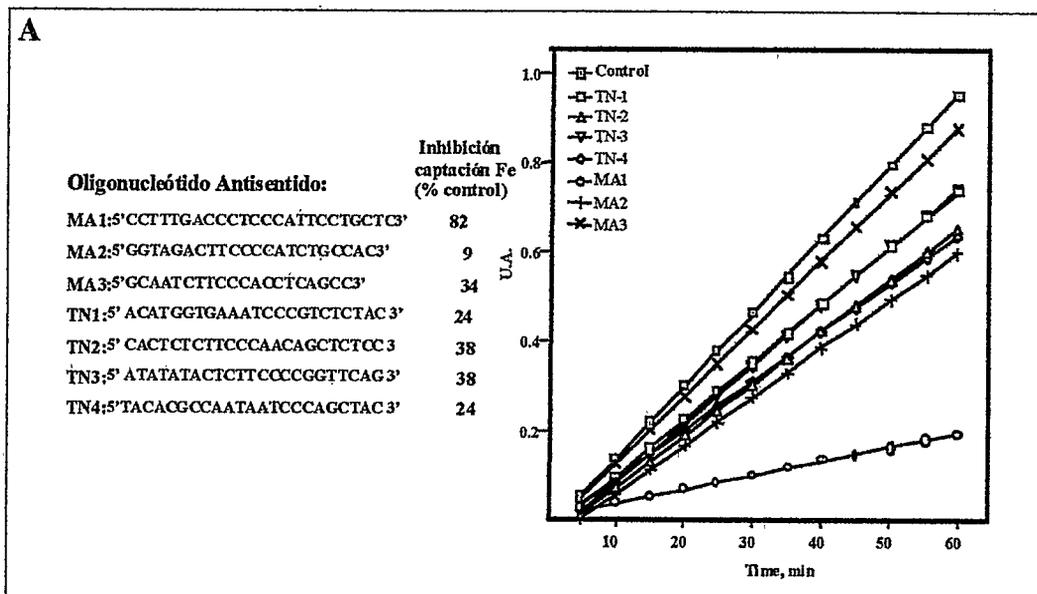
DMT1 es un transportador de metales divalentes, con potencial para transportar Fe, Cu, Cd, Zn y Mn (Gunshin et al., 1997). En la figura 13B podemos observar que el oligonucleótido antisentido MA1 inhibió la captación tanto de ^{59}Fe (82%) como la captación de ^{64}Cu (52%) con respecto de la captación del control, una demostración que DMT1 es el principal transportador de Fe y que el transporte apical de Cu en células Caco-2 es efectuado, a lo menos en un 50%, por DMT1.

Figura 13: Captación apical y transporte de Fe y Cu en presencia de oligonucleótidos anti DMT1:

A) Captación apical de ^{59}Fe por células Caco-2 controles en presencia de oligonucleótidos antisentido de DMT1. Las células fueron crecidas por dos semanas en insertos bicamerales con membranas de policarbonato en DMEM, 10% SFB. Tres días previos al experimento de transporte las células fueron transfectadas con oligonucleótidos antisentidos como se describió en métodos. El día del experimento,

las células fueron incubadas a 37°C por 1 a 60 minutos con 10 μM $^{59}\text{FeCl}_3$ como complejo ^{59}Fe -NTA (1:2.2) por el lado apical del inserto.

B) Captación apical de ^{59}Fe y ^{64}Cu por células Caco-2 en presencia de oligonucleótidos antisentido de DMT1. Las células Caco-2 controles fueron cultivadas como en A. El día del experimento, las células fueron incubadas a 37°C por 1 a 60 minutos con 10 μM ^{59}Fe o con 10 μM ^{64}Cu por el lado apical del inserto.



3.14 Estudios de captación y transporte de Cu en células Caco-2 con distintas concentraciones de Fe intracelular: Sí DMT1 es un transportador fisiológico de Cu en células Caco-2, en función del principio de homeostasis celular, el transporte de Cu podría ser regulado por los niveles celulares de Cu. Para probar esta hipótesis, se determinó la cinética de captación apical y transporte de Cu en estas células. En células controles, wtHFE y HFE-H63D crecidas por dos semanas en insertos bicamerales con diferentes concentraciones de ^{55}Fe en el medio de cultivo. En estas condiciones se determinó las cinéticas de captación y transporte de ^{64}Cu (Figura 14). Al graficar las velocidades de transporte apical de ^{64}Cu como función de la concentración intracelular de ^{55}Fe se observa la típica curva de decaimiento para las células controles y HFE-H63D (Figura 14A, cuadrados rojos y azules respectivamente), mientras que la cinética de transporte apical de ^{64}Cu en las células HFE fue considerablemente más bajo que la cinética en las células controles ($p < 0,001$). Al considerar solamente los valores de la cinética de captación de Cu en las células wtHFE, estos no fueron diferentes entre ellas ($p > 0,5$) (Figura 14A, círculos amarillos).

Similarmente a lo observado con el transporte de Fe, las células HFE mostraron un transporte de ^{64}Cu considerablemente menor que las células controles (Figura 14B, círculos amarillos), en tanto que las células HFE-H63D presentaron velocidades de transporte de Cu similares a las células controles (Figura 14B, cuadrados azules y rojos respectivamente). El curso temporal de transporte de Cu apical y apical – basolateral en las células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D se observan en la Figura 14C. El transporte apical de las células wtHFE fue significativamente menor ($p < 0,01$) que las células controles, en tanto

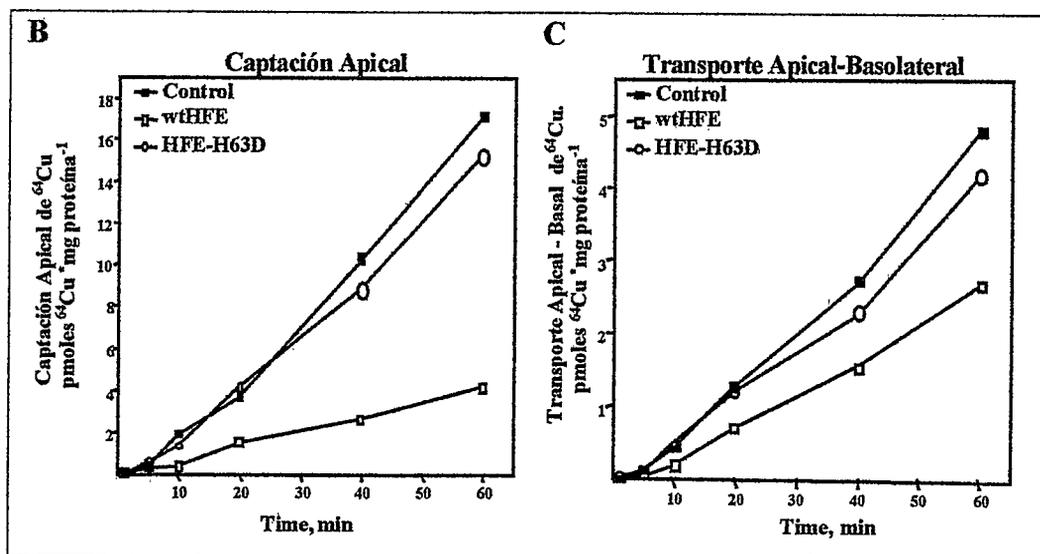
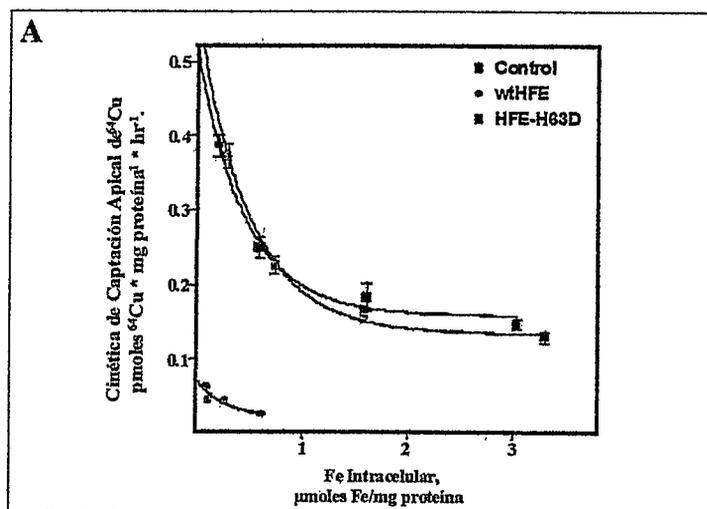
entre las distintas células estudiadas, en las células wtHFE fue menor que en las células controles y HFE-H63D.

Figura 14: Captación apical y Transporte apical-Basolateral de ^{64}Cu por células Caco-2 que sobrepresen wtHFE y HFE-H63D. Células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas por dos semanas en insertos bicamerales con membranas de policarbonato en DMEM, 10% SFB, $5 \mu\text{M}$ ^{55}Fe . El día del experimento, las células fueron incubadas a 37°C por 1 a 60 minutos con $10 \mu\text{M}$ ^{64}Cu por el lado apical. La reacción fue parada lavando los insertos con PBS/1 mM EDTA. La radioactividad de las membranas y del medio basolateral fue contada en un contador beta.

A) Cinética de captación apical de ^{64}Cu .

B) Curso temporal de captación apical de ^{64}Cu .

C) Curso temporal de transporte apical-basolateral de ^{64}Cu .



3.15 Estudios de competencia en la captación y transporte de Fe en presencia de Cu:

Con el objeto de determinar si existe competencia entre Fe y Cu por el transportador DMT1, se realizaron estudios de transporte de ^{59}Fe en presencia de Cu (1:10; mol:mol). Como se muestra en la figura 14, la presencia de cobre en el medio de transporte, produjo una inhibición tanto en la captación apical como en el transporte apical-basolateral, lo que se ve reflejado en los curso temporales de captación apical (Figura 15A) y transporte apical-basolateral (Figura 15B). Con el objeto de determinar una cinética de inhibición de la captación entre Fe y Cu, se realizó estudios de competencia entre Fe ($5\ \mu\text{M}\ ^{55}\text{Fe}$) y un rango amplio de concentraciones de Cu ($0,01 - 1000\ \mu\text{M}$) (Figura 15C). Se observó una inhibición de un 50% en la captación de Fe cuando la concentración extracelular de Cu fue de $6,8\ \mu\text{M}$. Cuando la relación Fe:Cu era de 1:10 respectivamente, la inhibición en la captación de Fe fue de un 80% aproximadamente. Las cinéticas de inhibición de la captación apical y de transporte apical-basolateral de Fe por Cu (relación 1:10, respectivamente), se observa en las figuras 15D y 15E. Se observa que la cinética de captación apical de Fe es inhibida, especialmente a bajas concentraciones de Fe intracelular esta inhibición puede alcanzar a un 70%. Sin embargo, en la cinética de transporte apical-basolateral, más que una inhibición, lo que se observa es un transporte dependiente de la disponibilidad del elemento, pues las pendientes de las cinéticas de transporte en los controles como en la competencia, son muy similares.

Figura 15: Captación apical y transporte apical-basolateral de ^{59}Fe en presencia de Cu por células Caco-2. Células Caco-2 fueron crecidas en insertos bicamerales en medio DMEM, 10% SFB, suplementado con ^{55}Fe (rango $0,5$ a $20\ \mu\text{M}$). El día del experimento, las células se incubaron a 37°C por 1 a 60 minutos con $5\ \mu\text{M}\ ^{59}\text{Fe}$ (Fe-NTA) y $50\ \mu\text{M}$ de

Cu (Cu-His) por el lado apical del inserto. La radioactividad de las membranas y del medio basolateral fue contada en un contador beta.

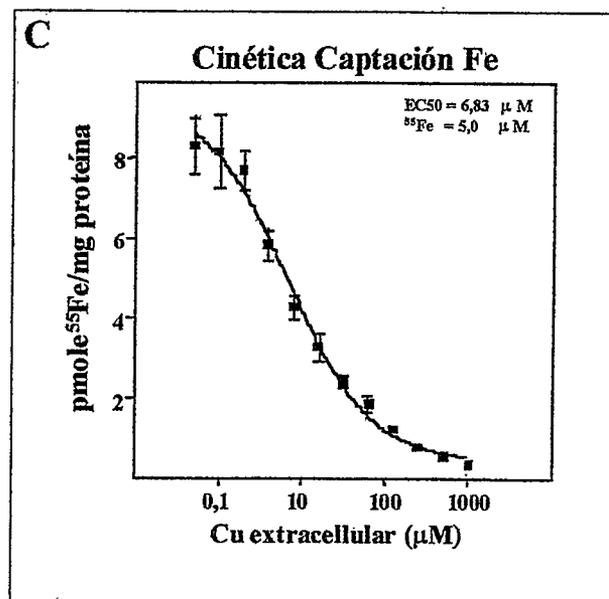
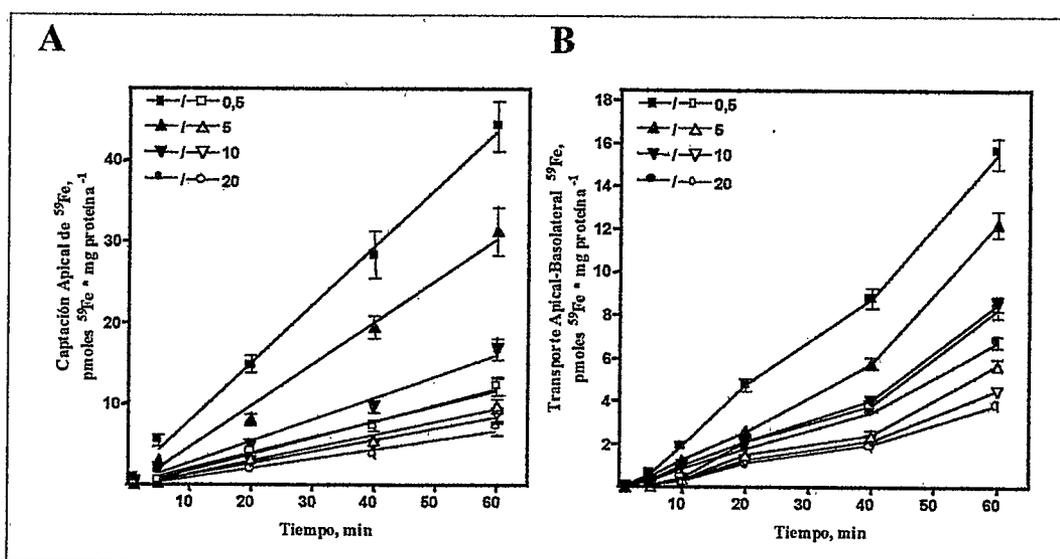
A) Curso temporal de captación apical de Fe (símbolos cerrados: control; símbolos abiertos: Fe-Cu).

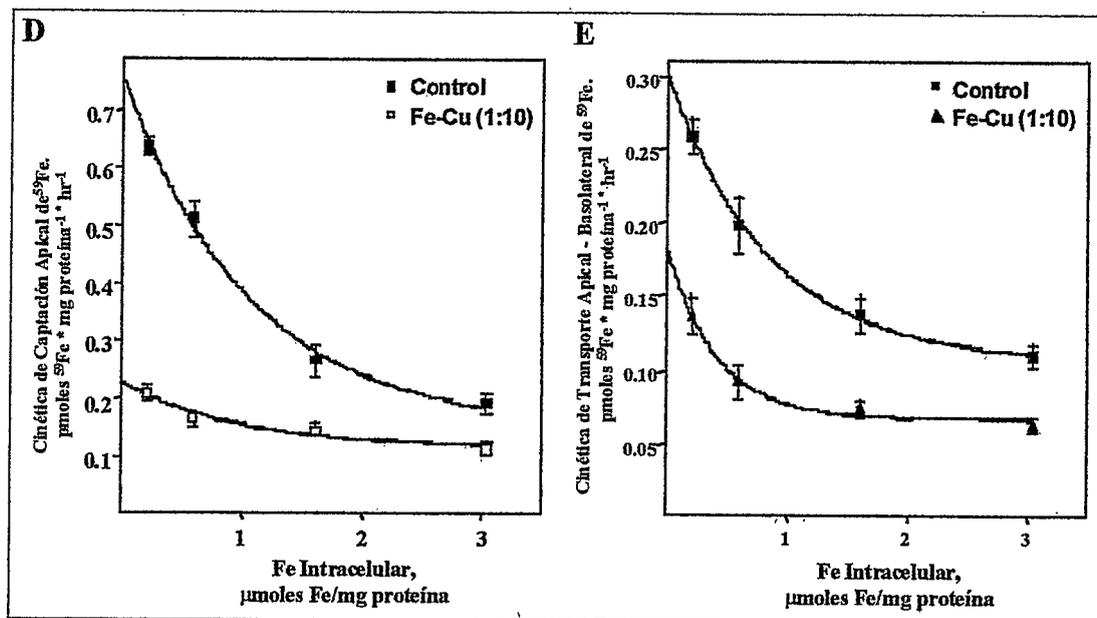
B) Curso temporal de transporte apical-basolateral (símbolos cerrados: control; símbolos abiertos: Fe-Cu).

C) Cinéticas de captación apical de Fe ($5 \mu\text{M}$ ^{59}Fe) en presencia de concentraciones crecientes de Cu (0,01 – 1000 μM , en la forma de Cu-his).

D) Cinética de transporte apical-basolateral (símbolos cerrados: control; símbolos abiertos: Fe-Cu).

E) Cinética de inhibición de captación entre Fe y Cu.



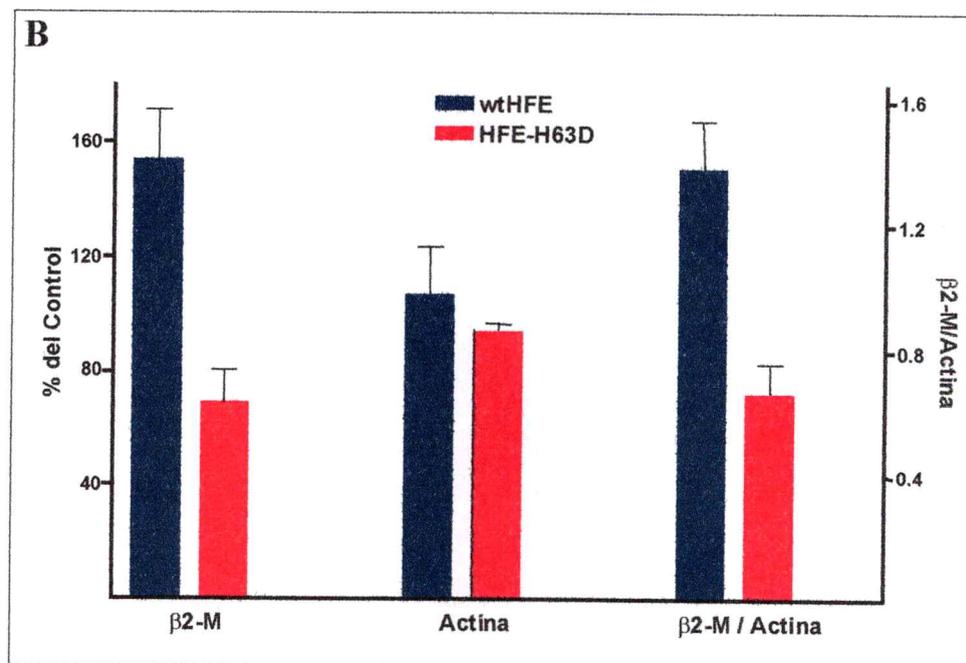


3.16 Expresión de la proteína β 2-microglobulina en células Caco-2 que sobrexpresan wtHFE y HFE-H63D. Debido a que la expresión de la proteína HFE en la membrana plasmática es dependiente de la chaperona β 2-microglobulina, una posibilidad de los cambios observados por la sobrexpresión de HFE, es que la β 2-microglobulina se encontrara disminuida o ausente en estas células. Por ello, estudiamos la expresión de la β 2-microglobulina en las células controles, wtHFE y HFE-H63D. La figura 16A, muestra un western blot representativo para β 2-M. Se observó que las células controles expresaban β 2-M, más aún, en las células wtHFE se encontró un leve aumento en la expresión de β 2-M con respecto a las células controles y HFE-H63D. A pesar que el aumento es de la expresión de la β 2-M fue solamente de 1,52 veces con respecto a las células controles (Figura 16B), esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$). La expresión de β 2-M en las células HFE-H63D fue menor que en las células controles en un 30%.

Figura 16: Inmunodetección de β 2-microglobulina en células Caco-2 que sobrexpresan HFE.

A) Inmunodetección de β 2-microglobulina: Extractos celulares de células Caco-2, wtHFE y HFE-H63D fueron sometidos a inmunodetección por Western blot usando un anticuerpo policlonal contra β 2-microglobulina (Dako Co.).

B) Análisis densitométrico de las bandas de β 2-microglobulina. (n=3)



3.17 Distribución del transportador DMT1 y HFE en células Caco-2 que sobrepresan la proteína HFE. Debido a que la sobrepresión de HFE produce una fuerte disminución de la captación apical de Fe aun con niveles mayores de expresión de DMT1, estudiamos la posibilidad que la sobrepresión de HFE produzca un cambio en la distribución del transportador DMT1. Para ello, se determinó la distribución apical/basolateral de DMT1 por biotilación.

La sobrepresión de la proteína HFE produjo un cambio en la distribución del transportador DMT1. La sobrepresión de HFE y de HFE-H63D indujo un aumento de los niveles de DMT1 en la membrana basolateral (Figura 17A). Se observó que la sobrepresión de HFE y HFE-H63D disminuye significativamente ($p < 0,01$) la relación apical/basolateral del transportador DMT1 desde 2,5 UAF en las células controles a 0,99 y 1,34 en las células wtHFE y HFE-H63D respectivamente (Figura 17B). Sin embargo, esta disminución en la relación de distribución apical/basolateral de DMT1 inducida por la sobrepresión de HFE no explica la marcada disminución en la captación apical de Fe observada en las células wtHFE, ya que, a pesar de este cambio en la distribución, aún se puede visualizar niveles normales del transportador en la membrana apical. Así, la redistribución de DMT1, no se sería la causa directa de la disminución en la actividad de captación apical de Fe y por lo tanto otro(s) mecanismos deberían estar involucrados que permitan explicar la marcada disminución de la captación apical de Fe observada en las células wtHFE.

La sobreexpresión de HFE en las células Caco-2, produjo un cambio en la distribución del transportador DMT1. Fue de interés entonces determinar si la sobreexpresión de HFE produce un cambio en la distribución de la proteína HFE en si misma. La sobreexpresión de HFE en las células wtHFE indujo un aumento de los niveles de HFE en la membrana apical (Figura 17C). La sobreexpresión de HFE aumentó significativamente ($p < 0,01$) la relación apical/basolateral de la proteína HFE, desde 0,75 UAF en las células controles a 1,42 UFA en las células wtHFE (Figura 17D). La relación apical/basolateral en las células HFE-H63D (0,65 UFA) fue similar a la observada en las células controles. Este aumento en la relación apical/basolateral de HFE, podría explicar el efecto de la sobreexpresión de HFE sobre el la captación apical de metales a través del transportador DMT1.

Como control de la distribución y de la marcación con biotina/estreptavidina, realizamos determinación de la distribución del receptor para transferrina en las células controles, wtHFE y HFE-H63D. El RTf es una proteína que se localiza en la membrana basolateral de las células Caco-2 (Hughson and Hopkins, 1990; Núñez et al., 1996). Como se observa en la figura 17E, la distribución de RTf en estas células fue exclusivamente en la membrana basolateral, lo que nos permitió asegurarnos por un lado que la metodología empleada fue adecuada y por otro lado, los cambios en la distribución de DMT1 y HFE es un efecto de la sobreexpresión de la proteína HFE en las células wtHFE.

Figura 17. Distribución de DMT1 y HFE en células Caco-2 que sobreexpresan la proteína HFE.

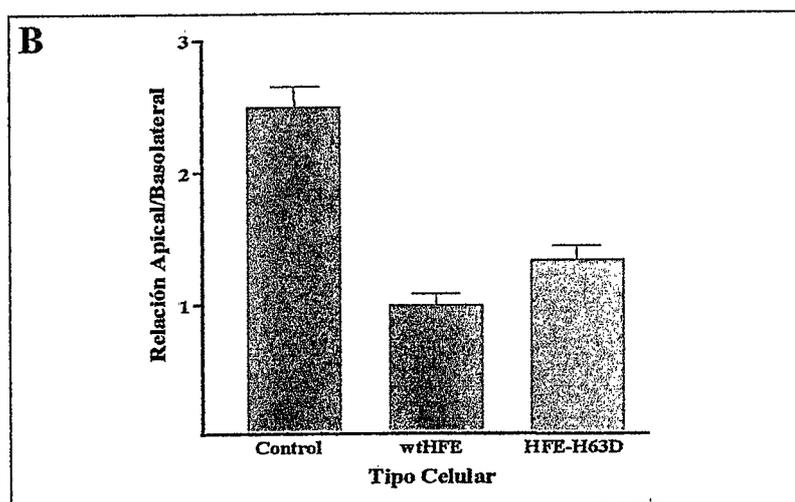
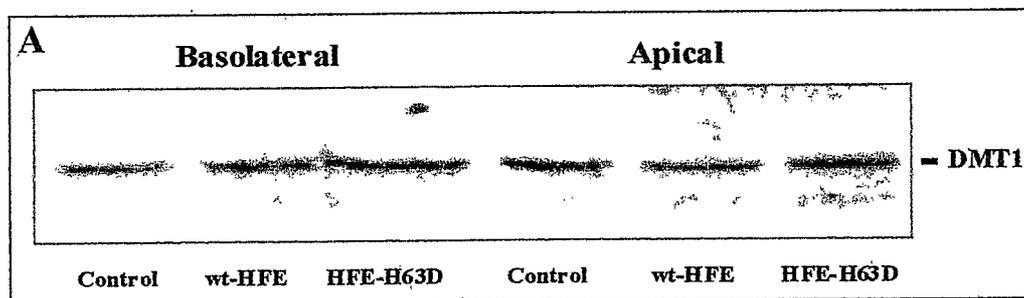
A) Expresión de DMT1 en las membranas Apical y basolateral. Células control, wtHFE y HFE-H63D crecidas en insertos fueron biotinilados apical o basolateralmente. Extractos celulares fueron preparados y precipitados con estreptavidina inmovilizada. Los precipitados fueron resueltos en gel PAGE-SDS 8% y DMT1 fue reconocido por Western blot.

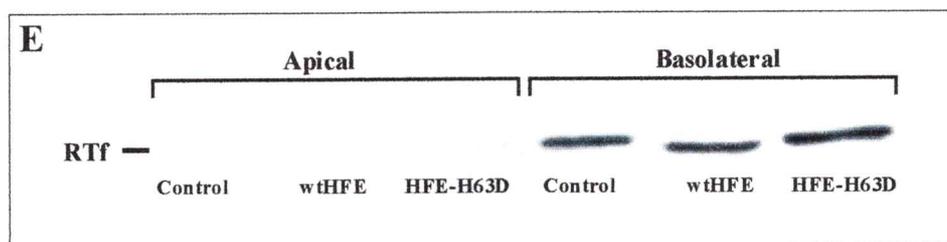
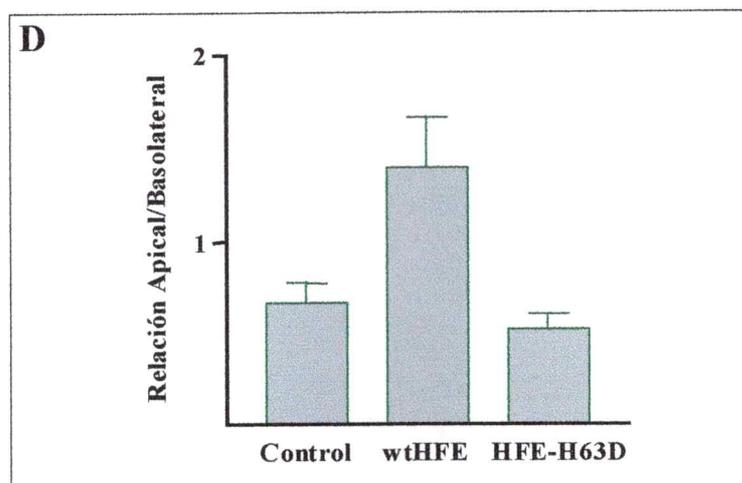
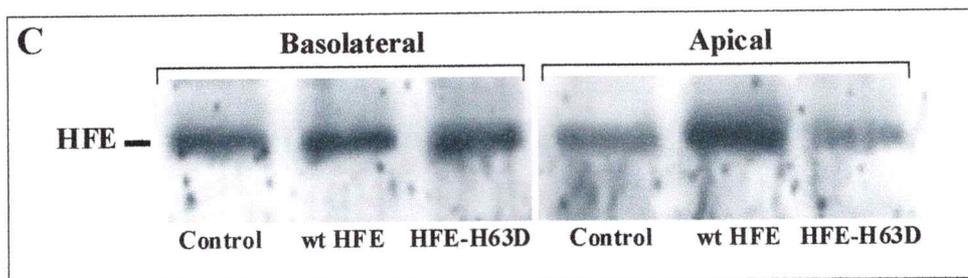
B) Análisis densitométrico. La distribución de DMT1 fue cuantificada por análisis de intensidad de bandas usando el programa Quantity One software (BioRad). Los resultados fueron expresados como la relación de distribución de DMT1 entre las membranas apical y basolateral (promedio \pm DE; n = 3).

C) Expresión de HFE en las membranas Apical y basolateral. Las membranas de A fueron reprobadas con anticuerpo contra HFE.

D) Análisis densitométrico. Cuantificación por densitometría de la distribución de HFE (promedio \pm DE; n = 3).

E) Expresión de RTf en membrana apical y basolateral. En células tratadas como antes, se realizó Western blot contra RTf, utilizando un anticuerpo monoclonal anti RTf (OKT9).





3.18 Inmunolocalización de HFE en células que sobrepresan la proteína wtHFE y HFE-H63D: Con el objetivo de determinar la localización intracelular de la proteína HFE, se realizó inmunolocalización de la proteína HFE en estas células y se visualizó por microscopía confocal (Figura 18). La figura 18A muestra un imagen a 6 μm de la membrana basolateral, y los círculos representan los bordes de las células. En ella se puede observar que en las células Caco-2 controles y HFE-H63D, la proteína HFE se localiza

principalmente en la membrana plasmática basolateral, mientras que las células Caco-2 que sobreexpresan la proteína wtHFE presentan una inmunolocalización preferentemente medial sin poder determinar si esta localización es en la membrana plasmática o a nivel intracelular. Al analizar la distribución en el eje apical-basolateral (donde las elipses delimitan la célula), se puede observar que en las células controles y HFE-H63D, la distribución es preferentemente basolateral, sin embargo en las células wtHFE se observa un desplazamiento de la localización en el eje basal-apical hacia medial y apical en la célula (Figura 18B). La inmunolocalización del RTf, proteína reconocidamente basolateral, se muestra con fines comparativos. Igual distribución se observa en la inmunolocalización de HFE-H63D. Al cuantificar las secciones basolateral-apical obtenidas por microscopía confocal, se observa que la proteína HFE en las células controles y HFE-H63D se localiza principalmente a nivel de membrana basolateral, en cambio en las células wtHFE, la proteína se localiza principalmente a nivel medial en la célula, ya sea en la membrana ó intracelularmente (Figura 18C).

La figura 18D, muestra un modelo propuesto de la distribución de la proteína HFE en las células controles, wtHFE y HFE-H63D, en base a los estudios de biotilación e inmunolocalización. En las células controles, HFE se localiza principalmente en la membrana basolateral y en un menor porcentaje en la membrana apical. Sin embargo, en las células wtHFE, la proteína HFE se distribuye tanto en la membrana basolateral, como apical, sin descartar una posible localización intracelularmente. La sobreexpresión de HFE-H63D, produce una distribución de la proteína principalmente en la membrana basolateral y un pequeño porcentaje se distribuye en la membrana apical.

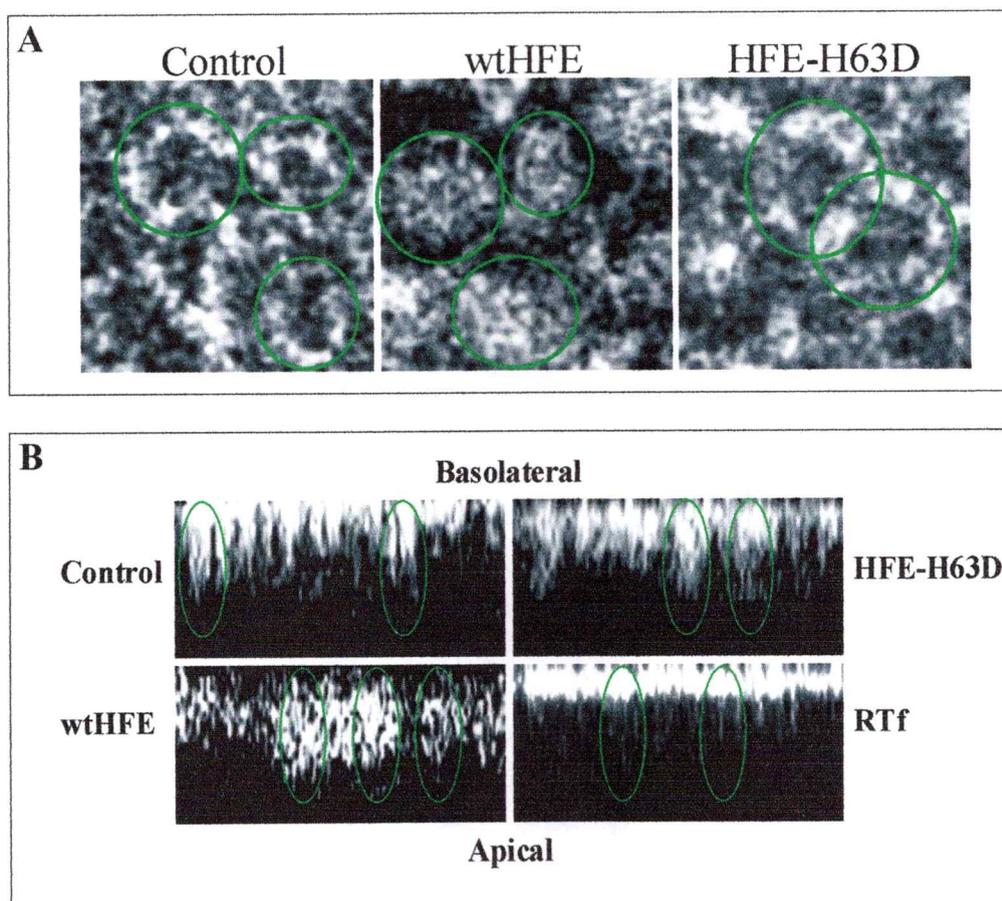
Figura 18: Immunolocalización de HFE en células Caco-2 que sobreexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D.

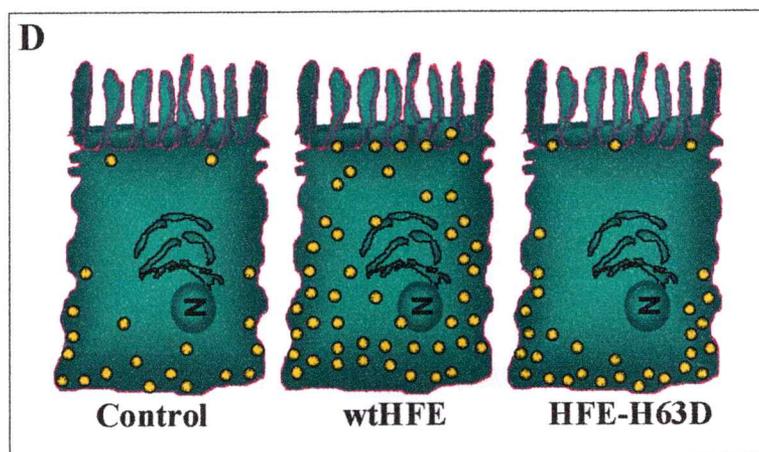
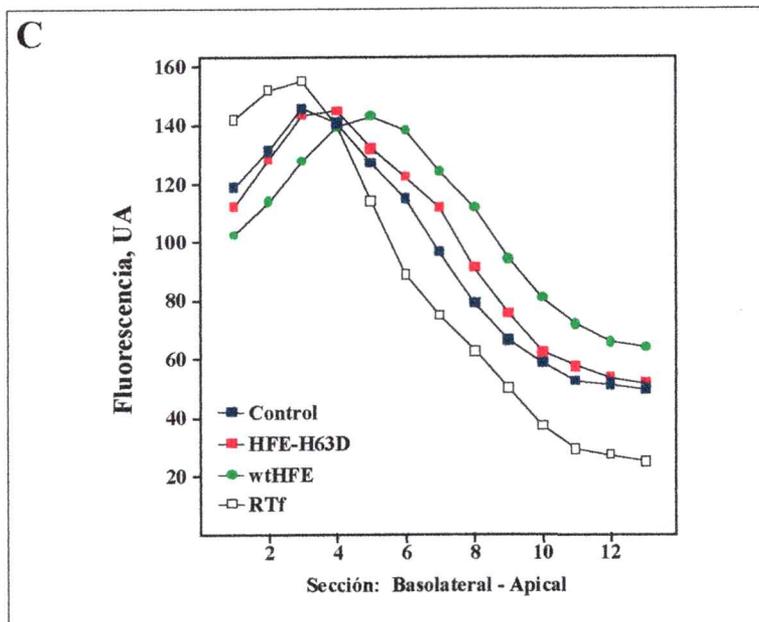
A) Immunolocalización de la proteína HFE en células controles, wtHFE y HFE-H63D. Las células fueron fijadas y solubilizadas como se describió en métodos e incubadas con anti-HFE seguido de una incubación con anticuerpo anti Ig G-FITC. La localización de HFE fue visualizada siguiendo la fluorescencia del FITC por microscopía confocal. Fotografía tomada a 6 μm de la membrana basolateral;

B) Immunolocalización en el eje basolateral-apical. Secciones ópticas de 2 μm desde basolateral hacia apical fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss MP40. Las secciones fueron integradas usando el software del instrumento. Se utilizó al RTf como control de localización basolateral.

C) Distribución celular de HFE. El eje basolateral-apical de células Caco-2 controles (n=20); wtHFE (n=20) y HFE-H63D (n=20) fue dividido en 13 secciones y la fluorescencia relativa de cada sección fue determinada por análisis densitométrico. La fluorescencia total de cada célula fue normalizada a 100 previo al cálculo de la fluorescencia relativa como una función de la posición basolateral-apical.

D) Modelo propuesto de distribución de la proteína HFE en las células Caco-2 transfectadas.





3.19 Inmunolocalización de DMT1 en células que sobreexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D: En las células controles y HFE-H63D, DMT1 se distribuyó preferentemente en la membrana plasmática y en el eje medial-apical. La inmunolocalización de DMT1 en las células que sobreexpresan wtHFE fue principalmente a nivel medial, sin poder definir si esta localización es membrana plasmática o intracelularmente. En las células controles y HFE-H63D se localizó principalmente a nivel medial y levemente en la membrana plasmática (Figura 19A). En el eje basolateral-apical, DMT1 en las células controles y HFE-H63D se localizó en la zona medial y apical, mientras que en las células wtHFE se observó un leve desplazamiento de DMT1, localizándose preferentemente en la zona medial-basolateral de la célula (Figura 19B). Al cuantificar las secciones basolateral-apical se observó que DMT1 en las células controles y HFE-H63D se ubicó principalmente a nivel medial-apical. La distribución de DMT1 en las células wtHFE presentó una leve redistribución con respecto a las células controles, esta localización fue preferentemente basolateral-medial (Figura 19C).

La figura 19D, muestra un modelo de la distribución del transportador DMT1 basado en los resultados de biotilación e inmunodetección. En las células controles, el transportador DMT1 se distribuye principalmente en la membrana apical, aunque existe un porcentaje que se localiza intracelularmente. Sin embargo, en las células wtHFE, DMT1 se redistribuye desde la membrana apical hacia la zona apical/medial e intracelularmente. La distribución de DMT1 en las células HFE-H63D es similar a las células controles, aunque existe una mayor expresión de la proteína en estas células.

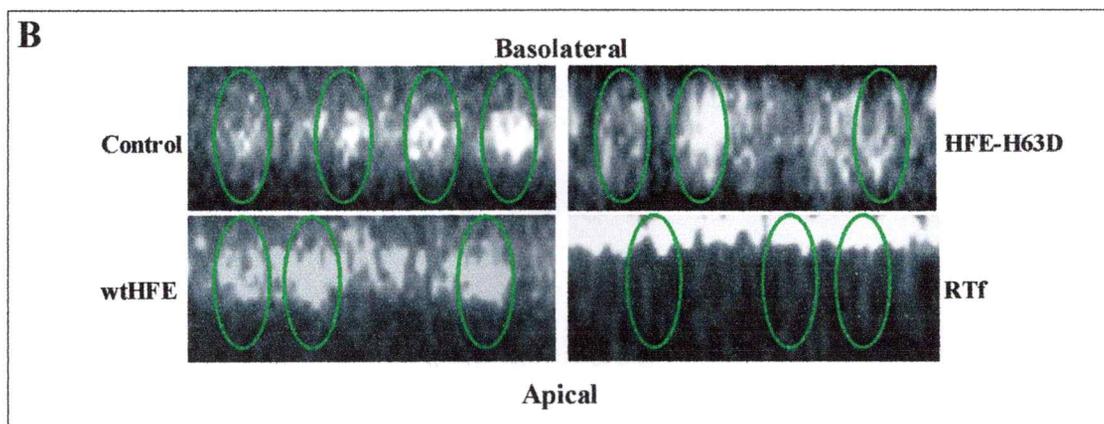
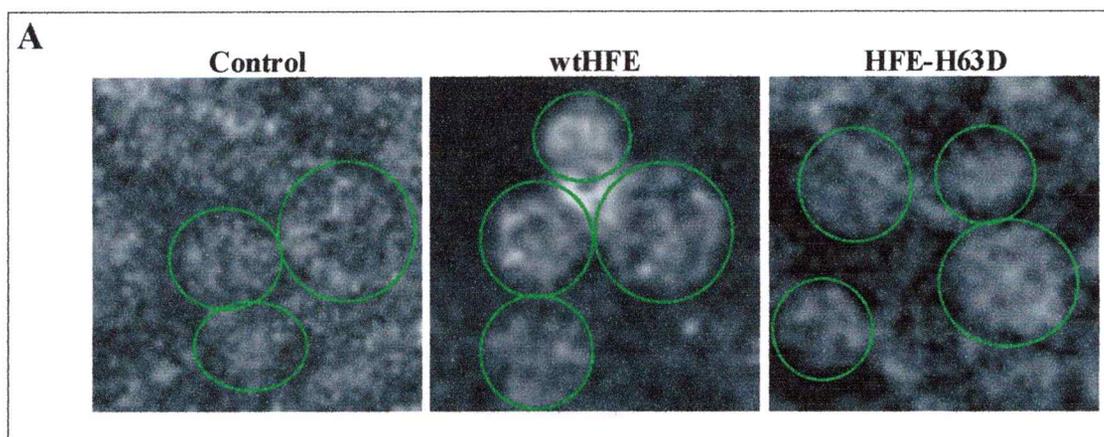
Figura 19: Immunolocalización de DMT1 en células Caco-2 que sobrexpresan la proteína wtHFE y HFE-H63D.

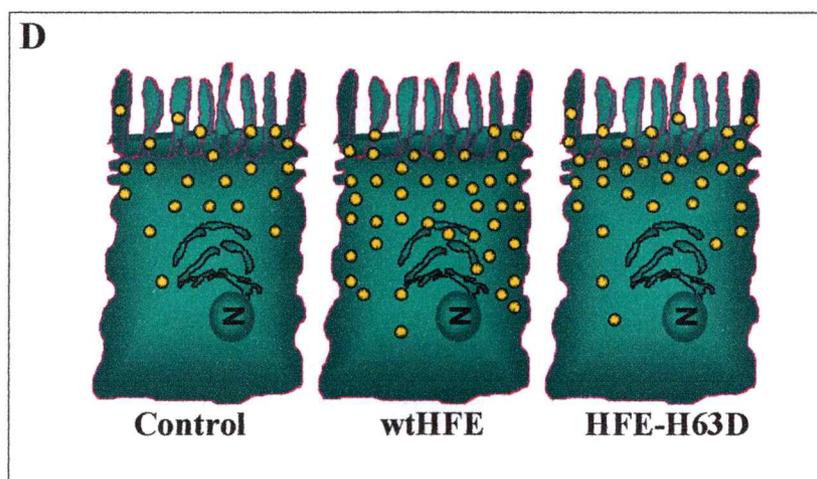
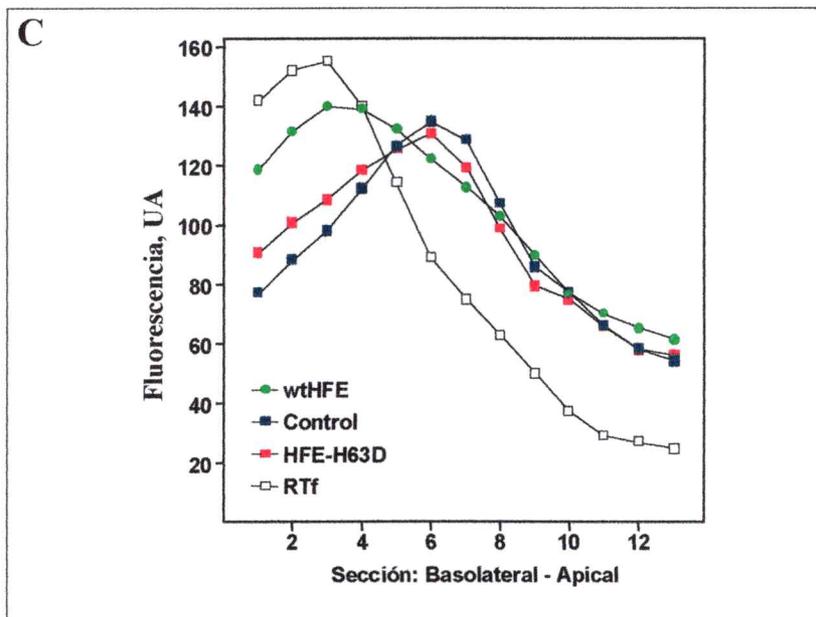
A) Immunolocalización de la proteína DMT1 en células controles, wtHFE y HFE-H63D. Las células fueron tratadas como se describió en métodos y luego incubadas con anti-DMT1 y seguido de anticuerpo anti IgG-FITC. La localización de DMT1 fue visualizada siguiendo la fluorescencia de FITC por microscopía confocal.

B) Immunolocalización en el eje apical-basolateral. Secciones ópticas de 2 μm desde basolateral hacia apical fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss MP40. Las secciones fueron integradas usando el software del instrumento. Se utilizó al RTf como control de localización basolateral. Se utilizó al RTf como control de localización basolateral.

C) Distribución celular de DMT1. El eje basolateral-apical de células Caco-2 controles; wtHFE y HFE-H63D fue dividido en 13 secciones y la fluorescencia relativa de cada sección fue determinada por densitometría (n=20). La fluorescencia total de cada célula fue normalizada a 100 previo al cálculo de la fluorescencia relativa como una función de la posición basolateral-apical.

D) Modelo propuesto de immunolocalización de DMT1 en las células Caco-2 transfectadas.

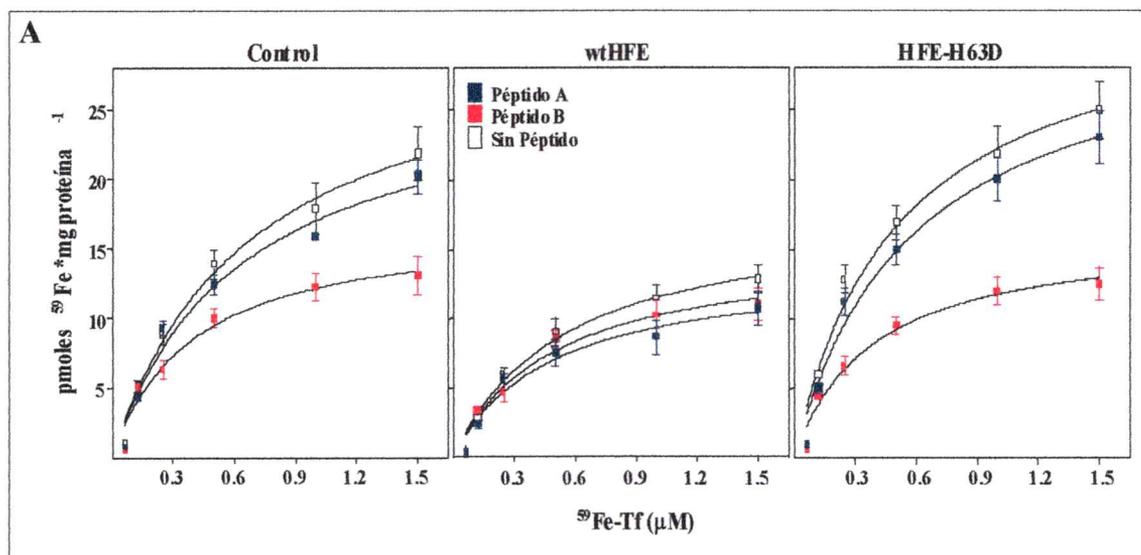




3.20 Estudios de internalización basolateral de Fe-Tf en presencia de péptidos sintéticos de HFE: El dominio $\alpha 1$ de HFE es reconocido como el dominio que interacciona con el RTf y fue de interés estudiar el efecto de péptidos sintéticos de este dominio sobre la velocidad de internalización de ^{59}Fe en la forma del complejo Tf- ^{59}Fe . Sintetizamos dos péptidos, ambos péptidos incluyen la histidina-63 la cual se encuentra mutada en la proteína HFE-H63D. La secuencia de los péptidos correspondió a A) $\text{NH}_2\text{-LSLFEALGYVDDQLFVFDHE-COOH}$ o B) $\text{NH}_2\text{-DHESRRVEPRTPWVSSRISSQ-COOH}$ y con ellos realizamos estudios de internalización de ^{59}Fe en presencia o ausencia de estos péptidos de HFE en las células controles, wtHFE y HFE-H63D.

Al incubar las diferentes tipos celulares con distintas concentraciones de $^{59}\text{Fe-Tf}$, el péptido A no produjo inhibición en la captación de ^{59}Fe desde Tf en las células controles ni HFE-H63D (Figura 20A). Valores menores eran esperados en las células wtHFE, por un efecto sinérgico entre la proteína wtHFE y el péptido A. El péptido B en cambio, produjo inhibición en la internalización de ^{59}Fe tanto en los controles como en las células HFE-H63D, llevándolas a niveles similares de las células wtHFE.

Figura 20A: Estudios de interacción entre la proteína HFE y el Receptor para transferrina: Inhibición en la internalización de ^{59}Fe desde Tf por péptidos del dominio $\alpha 1$ de HFE. Efecto de diferentes concentraciones de Tf- ^{59}Fe . Células controles, wtHFE y HFE-H63D fueron crecidas en insertos bicamerales en medio DMEM, 10% SFB, 5 μM Fe. El día del experimento, fueron lavadas con tampón salino e incubadas a 37 °C por 30 minutos en tampón salino suplementados con diferentes concentraciones de RTf-Tf- ^{59}Fe en el lado basolateral (rango 0,065 a 1,5 μM RTf-Tf- ^{59}Fe), en presencia o ausencia del péptido A ó B de HFE.



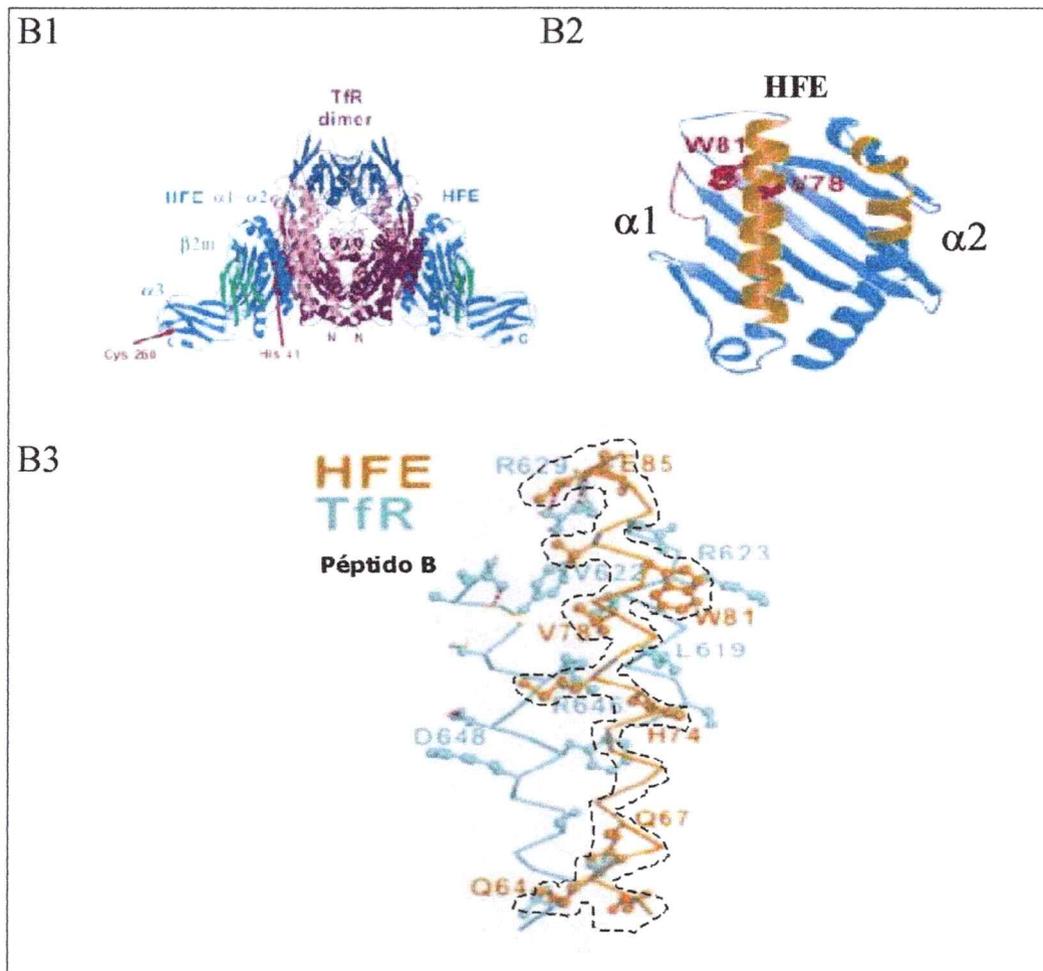
El estudio cristalográfico de la interacción entre HFE y RTf (Bennett et al., 2000) descentivó el desarrollo de esta investigación. Sin embargo, nuestros resultados confirman la importancia del segmento C-terminal de HFE en la interacción con RTf. En la figura 20B se muestra la interacción entre HFE y RTf (Bennett, 2000). En la figura 20B1 se muestra la interacción HFE-RTf. En la figura 20B2 los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HFE involucrados en la interacción HFE-RTf y en la figura 20B3 las secuencias de interacción del dominio $\alpha 1$ de HFE y de RTf. En línea punteada se visualiza la secuencia del péptido B.

Figura 20B: Modelo de interacción de HFE y RTf.

B1: Interacción HFE y RTf.

B2: Dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HFE involucrados en la interacción HFE-RTf.

B3: Interacción del dominios $\alpha 1$ de HFE y RTf. En línea punteada se visualiza la secuencia del péptido B.



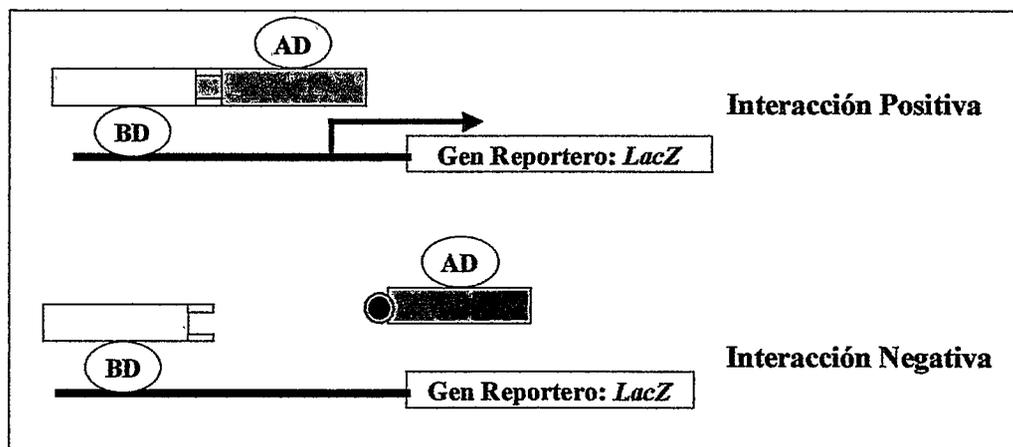
4. APÉNDICE 1

Estudios de interacción entre HFE y DMT1:

Durante el desarrollo de esta tesis, la interacción entre HFE y RTf ha quedado claramente demostrada, por lo que nuestro interés fue buscar una posible interacción entre HFE y DMT1. Aunque este objetivo no estaba inicialmente incluido en la tesis, realizamos algunos estudios conducentes a probar esta posible interacción. Sin embargo, hasta ahora, los resultados encontrados no son concluyentes. A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos en la búsqueda de esta interacción.

1) Ensayos con el sistema de doble híbrido. Con el objetivo de determinar si existe una interacción proteína-proteína entre HFE y el transportador DMT1, se realizaron ensayos de doble híbrido utilizando el sistema MatchMaker Gal4 Two-Hybrid System 3 (Clontech Lab., Palo Alto CA) en el laboratorio del Dr. Premysl Ponka, Lady Davis Institute, McGill University, Montreal, Canadá. En este sistema, el cDNA del transportador DMT1 y RTf fue clonado en el plasmidio pGBKT7, el cual lleva inserto una secuencia de unión a DNA. Los cDNA de DMT1, RTf, wtHFE y HFE-H63D fueron además clonados en el plasmidio pGADT7 el cual lleva un dominio de activación. Solamente cuando existe interacción entre las dos proteínas blancas se produce la activación del sistema, lo que se ve reflejado a través del gen reportero, en este caso *Lac Z*. (Figura 21A). En este sistema, ambos plasmidios después de la transformación van al núcleo.

Figura 21A: Modelo del sistema de doble híbrido MatchMaker Gal4 Two-Hybrid System 3.



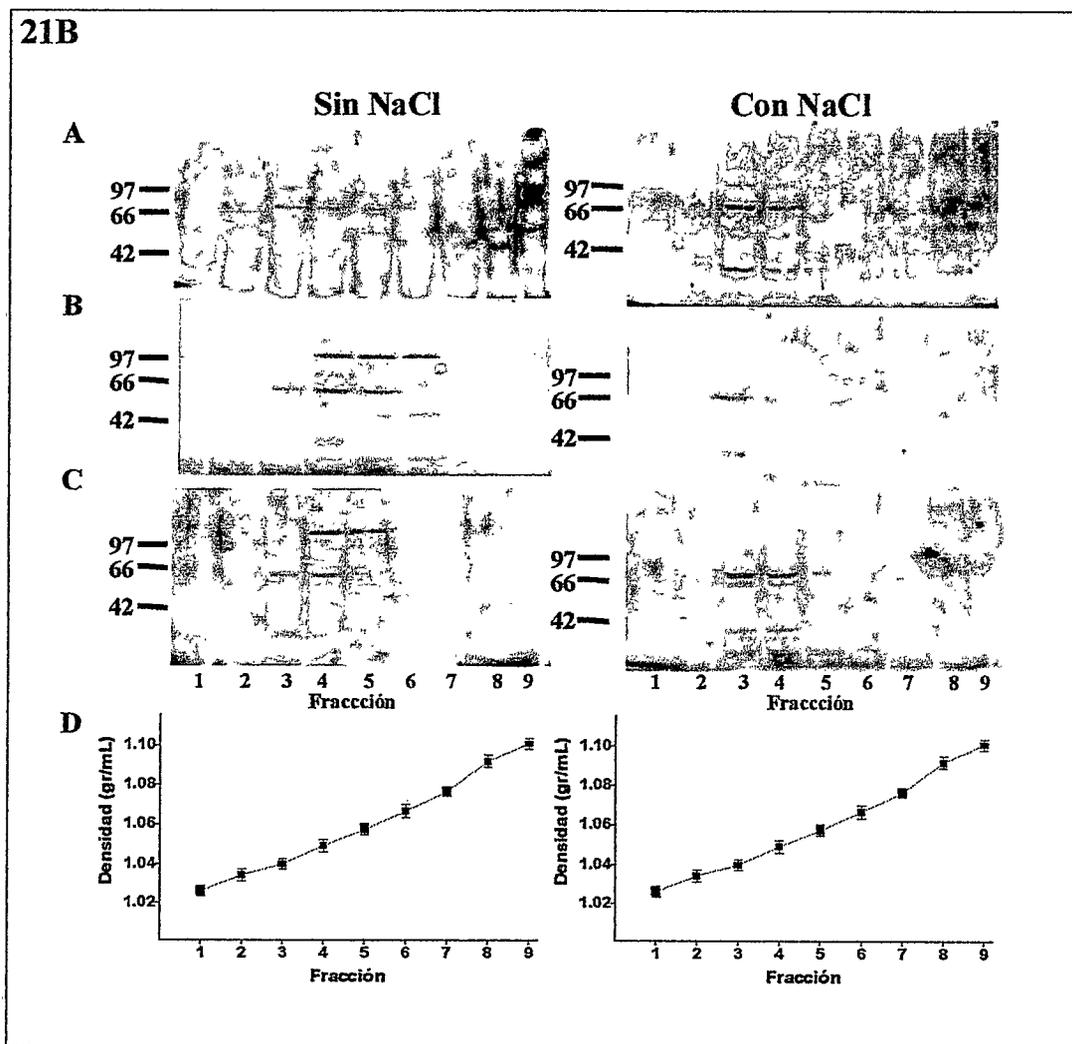
Al realizar los ensayos de doble híbrido no observamos activación del reportero. Aunque este resultado indica que no hay interacción entre las proteínas HFE y DMT1. La falta de activación del gen reportero puede deberse específicamente a problemas con la estructura secundaria del transportador DMT1. DMT1 presenta 12 segmentos putativos de transmembrana, por lo que la interacción de algunos de sus dominios con HFE podría estar impedida. Alternativamente, algunas proteínas híbridas pueden no ser establemente expresadas en sistemas de levaduras o pueden no localizarse en el núcleo de la levadura lo que no permitiría una exposición de los sitios de interacción con la proteína HFE. Para proteínas que interactúan normalmente en la superficie celular, quizás un sistema de expresión en fagos podría haber sido una mejor elección. Sin embargo, el sistema de doble híbrido ha sido utilizado para identificar interacciones de proteínas en la membrana celular (Kuo et al., 1997; Ozenberg and Young, 1995).

2) Coimmunoprecipitación de wtHFE y DMT1. Una segunda forma para verificar una posible interacción entre proteína es la coimmunoprecipitación. Para ello extractos de células Caco-2 controles, wtHFE y HFE-H63D fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti HFE o anti DMT1 por procedimientos estándares. Bajo estas condiciones experimentales tampoco fue posible observar una interacción entre estas dos proteínas. Tres posibles causas podrían explicar este resultado negativo: i) los anticuerpos contra HFE y DMT1, ambos preparados contra los dominios C-terminal de las proteínas, podrían disminuir la interacción HFE-DMT1, ó ii) la interacción HFE-DMT1 ocurre en condiciones celulares (pH, composición iónica, proximidad) no logradas en nuestro sistema de ensayo y iii) la solubilización con detergentes de los extractos celulares eliminaría la interacción entre HFE y DMT1.

3) Sedimentación en gradiente de sacarosa. Un tercer procedimiento utilizado para intentar verificar esta interacción entre la proteína HFE y el transportador DMT1, fue por medio de gradientes lineales de sacarosa. Para ello, se prepararon extractos celulares en ausencia de NP-40, con el objeto de no producir la disociación de complejos de membrana. Los extractos fueron resueltos en gradientes de sacarosa en ausencia o presencia de NaCl, con el objeto de preservar putativas interacciones iónicas entre las proteínas. Posteriormente, alícuotas de cada gradiente se sometieron a electroforesis en geles PAGE-SDS y DMT1 y HFE fueron detectados por metodologías de Western blot. La inmunodetección de las muestras obtenidas de los gradientes de sacarosa sin NaCl permitieron identificar con anticuerpo anti DMT1 una banda de 67 kDa, probablemente DMT1, principalmente en las fracciones 3, 4 y 5, en todos los tipos celulares estudiados. Además, se observa una banda de aproximadamente 110 kDa en las fracciones 4-6, que es evidente en las células wtHFE y HFE-H63D, que podría corresponder aun complejo de DMT1 y otra proteína en un compartimento intracelular. En los gradientes de sacarosa con NaCl se observó que este complejo de las fracciones 3-5 de 67 kDa se disocia y fue detectable principalmente en la fracción 3, en donde se observa una proteína con un peso molecular aparente similar al de DMT1 (Figura 21B). Por otro lado, en los gradientes con alta fuerza iónica el complejo de 110 kDa, ya no es aparente en ninguno de los tres tipos celulares. Este resultado nos indica que DMT1 se encuentra en más de un compartimento. Además, sugiere esté interaccionando electrostáticamente con otras proteínas, ya que cuando se aumenta la fuerza iónica, este complejo desaparece.

Figura 21B: Sedimentación en gradientes lineales de sacarosa: Inmunodetección de DMT1. Un mg de extracto de células controles, wtHFE y HFE-H63D se cargaron sobre gradientes lineales de sacarosa 5-25% con NaCl (0,5 mM) ó sin NaCl y se centrifugaron por 14 hr a 100.000 g a 4 °C. Se colectó 10 alícuotas de 500 μ L y 50 μ L de cada fracción fueron cargadas en geles PAGE-SDS 9%. Se realizó inmunodetección de DMT1 según se describió anteriormente.

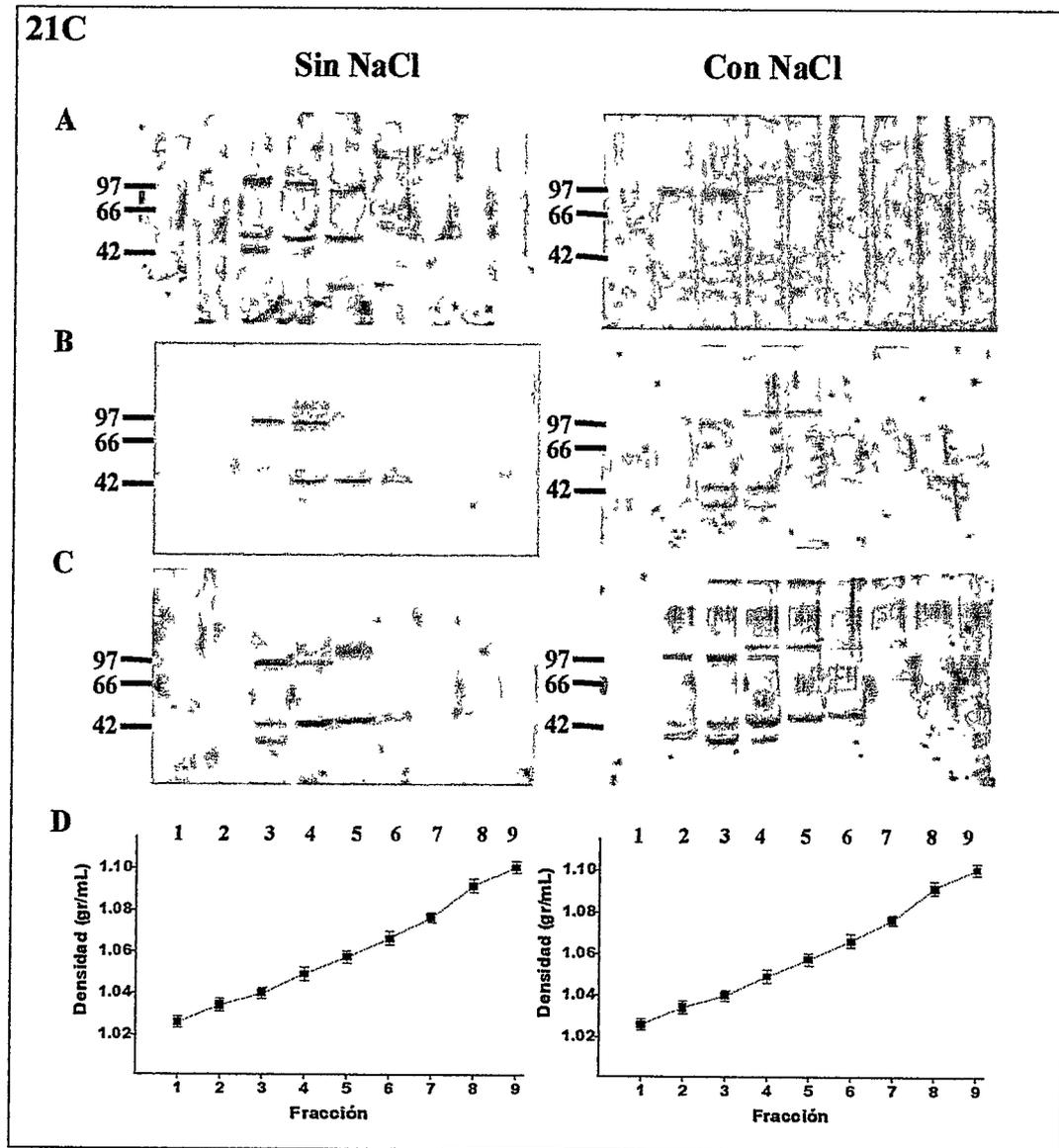
- A) Células controles con NaCl.
 B) Células wtHFE sin NaCl y con 0,5 M NaCl.
 C) Células HFE-H63D sin NaCl y con 0,5 M NaCl.
 D) Densidad de las fracciones



Al realizar la identificación de HFE en las diferentes fracciones de los gradientes (Figure 21C) se observó que en los gradientes sin NaCl, se observó una banda que coincide con el peso molecular aparente de HFE (47 kDa) en las fracciones 3-6 en los distintos tipos celulares estudiados. También es aparente una banda de aproximadamente 110 kDa, principalmente en las fracciones 3 y 5. Al analizar los gradientes con NaCl, se observó que el complejo de 47 kDa de las fracciones 3-6, se observa principalmente en las fracciones 3 y 4. La banda de 110 kDa, también se desplazó en el gradiente hacia las fracciones 2 a 4, pero no desaparece como ocurrió con el complejo de 110 kDa de los gradientes donde se estudio DMT1. Al igual como se describió anteriormente, este resultado muestra que HFE en los gradientes en ausencia de fuerza iónica, sedimenta en un rango amplio de densidades, el cual se angosta en presencia de sal, lo que sería una indicación que HFE se encuentra en más de una fracción intracelular. La formación de un complejo de mayor peso molecular aparente, nos indicaría la probable interacción de HFE con otra proteína, presumiblemente DMT1.

Figura 21C: Sedimentación en gradientes lineales de sacarosa: Inmunodetección de HFE. 1 mg de extracto de células controles, wtHFE y HFE-H63D se cargaron sobre gradientes lineales de sacarosa 5-25% con NaCl (0,5 mM) ó sin NaCl y se centrifugaron por 14 hrs a 100.000 g a 4 °C. Se colectaron 10 alícuotas de 500 µL y 50 µL de cada fracción fueron cargadas en geles PAGE-SDS 9%. Se realizó inmunodetección de HFE según se describió anteriormente.

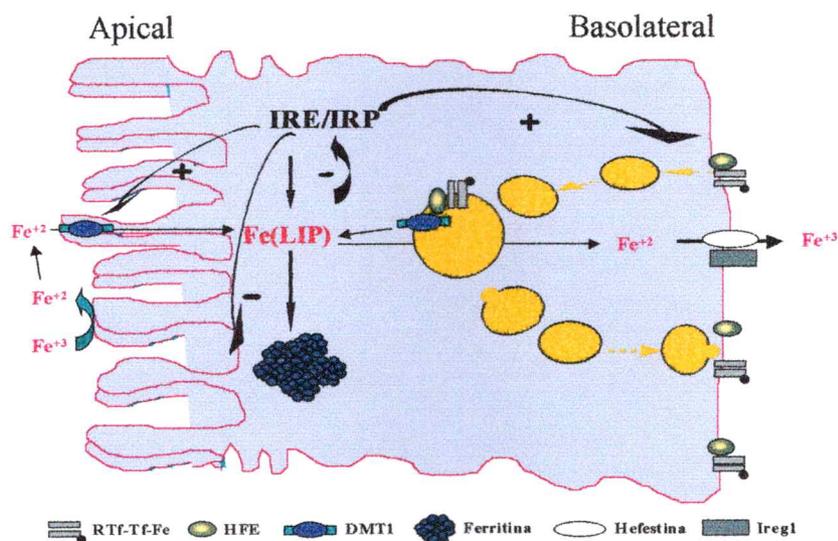
- A) Células controles con NaCl.
- B) Células wtHFE sin NaCl y con 0,5 M NaCl.
- C) Células HFE-H63D sin NaCl y con 0,5 M NaCl.
- D) Densidad de las fracciones



5. DISCUSION

Las reservas de Fe corporal son mantenidas relativamente constantes por un mecanismo regulatorio que limita la captación de Fe desde el intestino de tal modo que la iguala a las pérdidas fisiológicas. El modelo de absorción intestinal de Fe propuesto actualmente por nuestro laboratorio (Gárate and Núñez, 2000; Arredondo et al., 2001) indica que el contenido de Fe reactivo (LIP) controla a través del sistema IRE/IRP la síntesis de proteínas involucradas en la absorción de Fe (Figura 22).

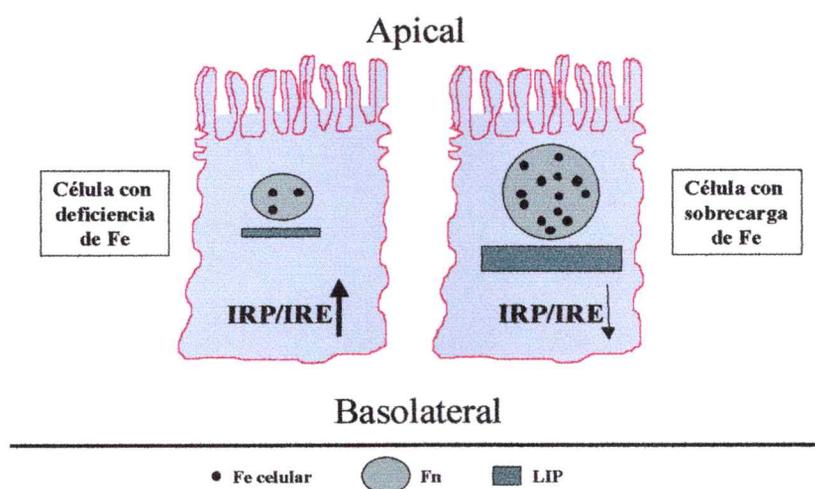
Figura 22: Mecanismo propuesto del transporte de Fe a través de la célula de epitelio intestinal: Regulación por sistema IRP/IRE.



Niveles altos de RTf y DMT1 median la entrada de Fe al compartimento de Fe reactivo y al aumentar el LIP disminuye la actividad IRE/IRP, lo que se manifiesta como un aumento la traducción del ARNm de la ferritina y un aumento en la degradación del

ARNm del RTf (Mullner et al., 1992; Arredondo et al., 1997). Las células que han sufrido este proceso se tornan más almacenadoras, por aumento del nivel de Fn y con menor capacidad de incorporar nuevo Fe vía endocitosis basolateral del RTf o captación apical por el transportador DMT1. Lo contrario sucede cuando el Fe intracelular disminuye, es decir, la actividad del sistema IRE/IRP aumenta y con esto disminuye la capacidad de almacenaje en Fn y se aumenta la actividad de captación de Fe mediada por endocitosis del complejo RTf-Tf en la membrana basolateral y un aumento de la captación a través del transportador DMT1 en la membrana apical del enterocito (Figura 23).

Figura 23: Modelo propuesto para la relación entre la concentración de Fe intracelular y la actividad del sistema IRP/IRE en células de epitelio intestinal Caco-2.



La absorción regulada de Fe observada en las células de epitelio intestinal de un individuo normal, se pierde en las personas que sufren de hemocromatosis hereditaria (HH) resultando en una absorción de Fe aumentada. El Fe es acumulado y se produce daño en órganos tales como hígado, páncreas, corazón, articulaciones y glándulas

endocrinas. A menudo esta enfermedad se asocia a cirrosis, diabetes, alteraciones de las gónadas y de la pigmentación de la piel (Carlson and Olsson, 2001). La concentración total normal de Fe en el adulto es de aproximadamente 3,5 gr, formando principalmente parte de la hemoglobina y almacenado en ferritina y hemosiderina. Si se permite una acumulación de este exceso de Fe por largos periodos de tiempo, se producirá daño a nivel de los órganos y cuando se realiza el diagnóstico, normalmente a los 50 años de edad, existirá un daño irreversible a los órganos anteriormente mencionados, con severas consecuencias para la salud del individuo.

Los mecanismos precisos por el cual las mutaciones en la proteína HFE producen un aumento en la absorción de Fe son pobremente comprendidos. La disminución de la afinidad de Tf por el RTf inducida por HFE resultaría en una disminución de la captación de Fe unido a Tf. Sin embargo, como se discutió anteriormente, a pesar del cambio en la constante de disociación de Tf por el complejo RTf-HFE (Feder et al., 1996; Lebron et al., 1998), la concentración de Tf en el plasma sanguíneo asegura una saturación total del RTf, independientemente de la presencia de HFE. Por lo tanto, otros aspectos de la regulación intestinal de Fe deben estar comprometidos en la HH.

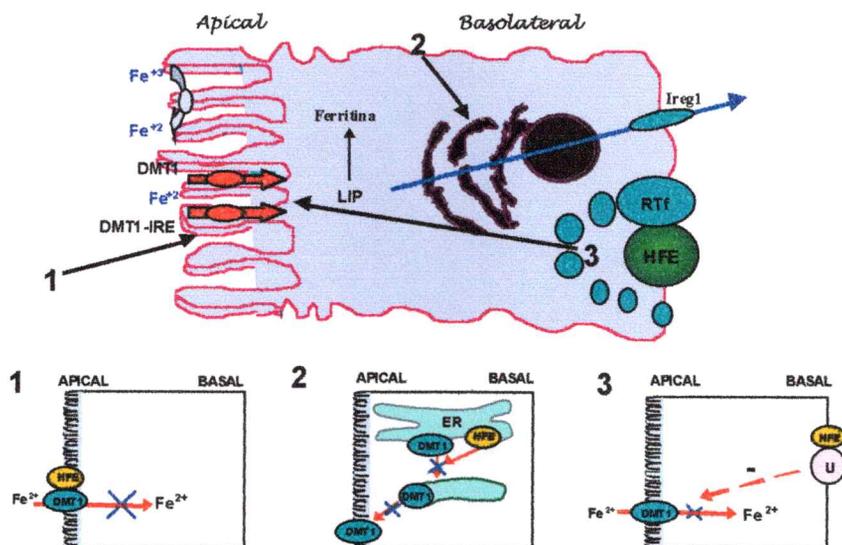
En este trabajo probamos la hipótesis que la proteína HFE silvestre es un regulador negativo de algunas de las etapas de la absorción intestinal de Fe y que esta regulación se pierde con las mutaciones que dan origen a la hemocromatosis hereditaria. Para ello, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de HFE silvestre y HFE-H63D sobre

el sistema de homeostasis celular de Fe y sobre la captación y el transporte de Fe por células tipo epitelio intestinal Caco-2.

Nuestros resultados indican que HFE es un inhibidor de la actividad de DMT1. Este es un nuevo descubrimiento que contribuye poderosamente a la comprensión del mecanismo de regulación del metabolismo de Fe y de la génesis de la hemocromatosis hereditaria. La proteína HFE hasta el momento tiene dos funciones reconocidas: a) interacción con el receptor para transferrina y b) inhibición del transportador DMT1. Ambos mecanismos no son opuestos y de hecho son complementarios. La interacción HFE-RTf permite la entrada de HFE al sistema endosomal, en donde podría regular negativamente la actividad de DMT1 y consecuentemente el transporte de Fe dissociado de la Tf en la vesícula endocítica (Núñez et al., 1990). La pérdida de esta regulación en la HH resulta en células con sobrecarga de Fe, como se observa en hígado, páncreas, corazón y músculo. En células de epitelio intestinal, la desregulación del transportador DMT1 resultaría en un incremento del transporte apical de Fe, el principal punto de control de la absorción del metal. Hasta el momento no ha sido posible identificar una interacción directa entre la proteína HFE y el transportador DMT1, aunque se ha demostrado su presencia en vesículas endocíticas y en la membrana apical del enterocito. Las evidencias aquí mostradas, nos indican que existe un efecto regulador negativo, directo o indirecto, de HFE sobre el transportador. Los mecanismos moleculares que expliquen la interacción HFE-DMT1 son hasta ahora desconocidos. Postulamos tres posibles mecanismos de interacción entre HFE y DMT1. En el primero, sugerimos que la proteína HFE podría ejercer su efecto inhibitorio en la membrana

apical, al interactuar físicamente con DMT1 (Figura 24-1). La presencia de HFE en la membrana apical, mostrada en los experimentos de biotilación, avalan esta posibilidad. El segundo mecanismo propuesto, implica un efecto inhibitorio en la ruta de biosíntesis. Ahí, HFE interactuaría con DMT1, bloqueando su distribución a la membrana apical (Figura 24-2). La mayor distribución intracelular de DMT1 cuando se sobrexpresas HFE, avalan esta posibilidad. Finalmente, en el tercer modelo, HFE interactuaría con una proteína de la membrana basolateral (u), no identificada aún, desencadenando así, una cascada de activación, tipo segundos mensajeros, cuyo efecto final sería la inhibición del transportador DMT1 (Figura 24-3).

Figura 24: Modelo propuesto para la acción de la proteína HFE en el metabolismo intracelular de Fe en células de epitelio intestinal.



1. Caracterización de células Caco-2 que sobreexpresan la proteína HFE.

Nuestra primera aproximación al estudio de la proteína HFE y a su participación en el metabolismo de Fe en células Caco-2, fue determinar si estas células expresaban una proteína HFE silvestre. Para ello, a partir de RNA total de células Caco-2, obtuvimos el cDNA de HFE, el cual fue clonado en el plasmidio de expresión pcDNA₃ y luego secuenciado. La secuencia del marco de lectura abierto de HFE nos permitió confirmar que las células Caco-2 expresan la proteína HFE silvestre.

La transfección estable de las células Caco-2 con wtHFE y HFE-H63D y su sobreexpresión no alteró la morfología de las células Caco-2 ni su capacidad de formar monocapas celulares con uniones estrechas. Este resultado fue muy importante, pues nos permitió tener la seguridad de trabajar con células de características morfológicas similares a las normales. En estudios de Western blot determinamos un peso molecular aparente de 47,5 kDa para la proteína HFE, con una sobreexpresión de 2 - 3 veces más que en las células controles.

2. Caracterización del metabolismo de Fe en células que sobreexpresan HFE.

2.1 Contenido de Fe Intracelular.

La concentración intracelular de Fe es un importante regulador de la absorción del metal en las células Caco-2 (Alvarez-Hernández et al., 1994). Células HeLa que sobreexpresaban HFE, presentaron una disminución en el contenido de Fe intracelular y una disminuida captación de Fe dependiente de transferrina, generando un fenotipo deficiente en Fe (Roy et al., 1999; Corsi et al., 1999; Riedel et al., 1999). Por lo tanto,

fue importante determinar la concentración intracelular de Fe en estas células. Las células transfectadas con wtHFE presentaron una marcada disminución de su contenido de Fe intracelular al compararlo con las células controles y HFE-H63D. Una baja en el contenido de Fe intracelular en las células wtHFE, nos indicó ya sea una posible disminución en la entrada o un aumento en la salida de Fe en estas células.

2.2 Contenido de Fe reactivo (LIP).

Para confirmar los resultados de concentración intracelular de Fe, estudiamos el contenido de Fe reactivo el cual inequívocamente refleja el estatus intracelular de Fe (Tapia et al., 1996; Gárate and Núñez, 2000; Roy et al., 2002). Observamos un LIP disminuido en las células wtHFE con respecto a las células controles, en tanto que el LIP en las células HFE-H63D fue muy similar al observado en las células controles. Por lo tanto, los niveles de Fe reactivo intracelular se correlacionan directamente con el Fe total presente en las células transfectadas y control.

2.3 Interacción entre HFE y Receptor para transferrina.

El prominente rol que tiene el RTf en la adquisición de Fe, así como la afinidad entre HFE y RTf, sugieren que la formación del complejo HFE-RTf es crítico para la función de HFE en el metabolismo de Fe. Sin embargo, se ha demostrado que la velocidad de internalización y externalización del RTf no dependería de los niveles de HFE (Ramalingan et al., 2000). La proteína HFE interacciona con el receptor para transferrina en la superficie de la membrana celular, disminuyendo la afinidad del RTf por Tf en 5 a 10 veces (Feder et al., 1998; Lebron and Bjorkman, 1999a; Lebron et al.,

1999b). Estudios de sobreexpresión de HFE en células HeLa mostraron que la internalización de HFE en compartimentos endosomales depende de su unión al RTf (Ramalingam et al., 2000), proceso que es complementado por la acidificación del pH endosomal, que promueve la disociación del complejo HFE-RTf (Bennett et al., 2000). Estos resultados indican que HFE alcanza compartimentos endosomales en un proceso dependiente de RTf. Como DMT1 es el transportador que saca el Fe endosomal hacia el citosol (Tabushi et al., 2000; Burdo et al., 2001), proponemos que HFE regula el transporte de Fe desde el lumen del endosoma al citosol. Nuestra observación que la incorporación de Fe unido a Tf está disminuida en células Caco-2 que sobreexpresan HFE apoya esta hipótesis.

El RTf une transferrina (apo; mono o diférrica) plasmática a pH 7,4, y el complejo RTf-Tf es internalizado en endosomas ácidos donde el Fe es liberado desde la Tf. El Fe del endosoma es luego entregado al citoplasma a través del transportador DMT1, donde es usado en las necesidades metabólicas o incorporado en ferritina para su almacenaje. A pesar de la disminución del número de RTf con el aumento en la concentración de Fe intracelular, éstos tienen una participación activa en la movilización de Fe desde y hacia la célula. Estudios de Alvarez-Hernández (1991; 1994), demostraron que células con bajo Fe, y en menor grado las células con alto Fe intracelular, presentaron un gran incremento en el flujo de ^{59}Fe desde el medio apical al basolateral en presencia de apo-transferrina en el medio basolateral. Este flujo puede ser explicado por la interacción que ocurre entre RTf y apo-Tf, en donde la apo-Tf sería endocitada a la célula y una vez en ella, tomaría el Fe y lo sacaría de la célula, en un proceso inverso

al de endocitosis (Núñez et al., 1996; Tapia et al., 1996). Estas evidencias muestran que el RTf no solamente funciona como un elemento capaz de introducir Fe de origen plasmático a la célula a través del ciclo endocítico, sino que además es capaz de sacarlo cuando la especie endocitada es apo-Tf.

Una segunda forma en que abordamos el efecto de la interacción entre HFE y RTf fue realizando estudios de inhibición por competencia de la interacción entre HFE y RTf con dos péptidos sintéticos del dominio $\alpha 1$ de HFE. Para ello, utilizamos dos péptidos: péptido A: LSLFEALGYVDDQLFVFDHE cuya secuencia aminoacídica va del aminoácido 43 al 64 ó péptido B: DHESRRVEPRTPWVSSRISSQ cuya secuencia va desde el aminoácido 62 al 82 de la proteína HFE. El péptido B produjo una disminución en la velocidad de internalización de ^{59}Fe desde el complejo Tf-Fe. Este resultado está de acuerdo con observaciones recientes de Lebron y Bjorkman, (1999a) y Lebron y colaboradores (1999b), quienes demostraron que además de la his-63, los aminoácidos Val78 y Trp81, ambos incluidos en el péptido B y que son de importancia en la interacción con el RTf, por sus características de aminoácidos hidrofóbicos expuestos a solventes. Por lo tanto, es posible que:

a) el péptido B rompa la interacción de HFE y RTf, disminuyendo la internalización de HFE. Sin embargo, si esto es así, el péptido B debería aumentar la captación de Fe a partir del complejo RTf-Tf-Fe, lo que no fue observado en ninguno de los tipos celulares estudiados.

b) el péptido B, al igual que HFE, al interactuar con el RTf produzca un cambio conformacional que reprima o inhiba el proceso de endocitosis del complejo RTf-Tf-Fe. Hasta el momento se han reportado resultados contradictorios con respecto a esta posibilidad. Por un lado, Ramalingan y colaboradores (2000) han demostrado que la velocidad de internalización y externalización del RTf no dependería de los niveles de HFE (Ramalingan et al., 2000). Por otro lado, Waheed y colaboradores (2002) han mostrado que el complejo HFE- β 2M aumentaría tanto la velocidad de reciclaje del RTf como los niveles de RTf en la superficie celular en células CHO. A la luz de estos antecedentes, no cabe duda que se hace necesario mayores estudios que lleven a una mejor comprensión del mecanismo de regulación que ejerce HFE sobre el RTf.

c) que el péptido B reemplace a HFE internalizándose con el complejo RTf-Tf-Fe. De esta forma, el péptido B además, podría inhibir directamente al DMT1 endosomal ó el proceso de acidificación necesaria para la disociación del Fe de la transferrina

Cualquiera que sea el mecanismo involucrado en este proceso, el péptido B reduciría la incorporación de Fe desde transferrina como observado. Siendo el mecanismo más probable que el péptido B se internalice junto con el RTf e inhiba el transporte de Fe endosomal disminuyendo la entrada de Fe al citosol.

2. Sistema regulatorio IRP/IRE, receptor para transferrina y ferritina intracelular:

Como demostramos anteriormente (Arredondo et al., 1997), la actividad del sistema IRP/IRE es regulada por la concentración de Fe reactivo, pero este no es el

único estímulo capaz de activar el sistema. También lo hacen la activación de cascadas de proteínas kinasas (Schalinske and Eisenstein, 1996; Eisenstein, 2000) y la respuesta frente a estrés oxidativo y óxido nítrico (Drapier et al., 1993; Pantopoulos et al., 1996; Gehring et al., 1999; Caltagirone et al., 2001). Los estudios del sistema IRP/IRE en las células wtHFE mostraron que estas células presentaban un sistema regulatorio activo tanto por una mayor expresión de las proteínas IRP1 e IRP2 como por una mayor actividad de unión a ARNm de estas proteínas. Las células wtHFE presentaron una mayor expresión y actividad de las proteínas IRP comparado a las células controles y HFE-H63D. Estos resultados son consistentes con lo observado en las células wtHFE con un bajo nivel intracelular de LIP. La sobreexpresión de HFE, por lo tanto, no modificó la capacidad del sistema IRE/IRP de responder a las variaciones de Fe celular.

El receptor para transferrina localizado en la membrana basolateral de las células de la cripta y microvellosidades facilita la entrada de Fe a la célula desde el plasma por internalización de Tf-Fe₂ (Pietrangelo et al., 1992; Núñez et al., 1996). En estados de disminución de los depósitos de Fe, la expresión del RTf depende del nivel de Fe intracelular, mientras que el Fe absorbido por el enterocito es rápidamente entregado al plasma, la reducción del compartimento intracelular de Fe activa la expresión del RTf con el objeto de restaurar el balance de Fe interno (Pietrangelo et al., 1992). En el modelo en estudio, el número de RTf presentó un comportamiento inverso con respecto a la concentración de Fe interno en las células wtHFE, es decir, presentaron un mayor número de RTf que las células controles y HFE-H63D. Estos resultados apoyan la hipótesis que la expresión del RTf se encuentra aumentada en células con baja

concentración de Fe interno (Pietrangelo et al., 1992) y que el número de RTf es regulado inversamente por la concentración de Fe interno (Chan et al., 1994).

La disminución de la concentración intracelular de Fn en las células wtHFE se relaciona directamente con un contenido de Fe interno disminuido, existiendo una relación inversa entre la concentración de Fn y el número de RTf y una relación directa con el LIP. Tanto las células controles como HFE-H63D presentaron niveles mayores de Fn que las células wtHFE. Estos resultados son inesperados, ya que los enterocitos de individuos con HH, presentan niveles de Fn más bajo que individuos sanos. Sin embargo, nuestros resultados se correlacionan directamente con las concentraciones de Fe interno en esas células y lo que es más importante aún, inversamente con la actividad del sistema IRP/IRE (Arredondo et al., 1997). Roy y colaboradores (2000), mostraron resultados similares a los nuestros en células HeLa. Al sobreexpresar la proteína wtHFE, mostraron una disminución de la concentración intracelular de Fn, efecto que no se observa en células que sobreexpresan HFE-C282Y. Las células que sobreexpresan HFE-H63D mostraron niveles similares de Fn a las células controles. Otros autores (Gross et al., 1998; Riedel et al., 1999; Corsi et al., 1999), han reportado resultados similares en células HeLa que sobreexpresan HFE. Sin embargo, aun con esta similitud de estos resultados, no debe descartarse una modulación de la regulación transcripcional del gen de la ferritina, por mecanismos independientes de Fe (Eisenstein, 2000).

En su conjunto, es decir, una baja concentración interna de Fe y Fn, un LIP disminuido y un número de RTf aumentados, se relacionan directamente con una

actividad aumentada del sistema IRP en las células wtHFE y un aumento moderado en las células HFE-H63D. Estos resultados demuestran que la proteína wtHFE establece un estado de depleción del LIP y el aumento de la actividad de IRP. A pesar de esto, los niveles celulares de Fe están disminuidos en las células wtHFE, por lo que el efecto más importante de HFE es sobre la actividad del transportador importador de Fe, DMT1 o sobre el transportador exportador de Fe, Ireg1. Esta inhibición no se observó en las células HFE-H63D, lo que significa que la proteína que lleva esta mutación pierde esta capacidad reguladora. Estos datos indican que los individuos con HH, al tener reducidos niveles funcionales de la proteína HFE, no podrían regular apropiadamente la captación de Fe a pesar de presentar un sistema IRP/IRE activo y funcional.

3. Estudios de captación apical y transporte apical-basolateral.

El aumento de la actividad IRP en las células wtHFE predecía que la captación apical de Fe debería encontrarse aumentada en estas células. Sin embargo, los experimentos de transporte con ^{59}Fe mostraron una captación muy disminuida en las células wtHFE, comparados con las células controles. Por otro lado, las células HFE-H63D mostraron niveles de captación de Fe similares a las células control a pesar que los niveles de expresión de la proteína HFE-H63D era similar a los de la proteína HFE en las células wtHFE. Estos hallazgos nos indican que un efecto principal de HFE fue la inhibición del proceso de incorporación apical de Fe. Este proceso, incluye la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} por Dcytb, la ferrireductasa de la membrana apical del enterocito (Dupic et al., 2002; Knopfel and Solioz, 2002) y el transporte de Fe^{+2} por DMT1. Este resultado es inesperado, si lo comparamos con resultados obtenidos previamente en nuestro

laboratorio (Tapia et al., 1996; Arredondo et al., 1997), en donde se observó que el proceso de captación de Fe fue inversamente proporcional a la concentración de Fe interno y se relacionaba directamente con la actividad del sistema IRP/IRE. Nuestros resultados de captación apical de Fe^{+3} y Fe^{+2} nos permitieron descartar un efecto inhibitorio sobre Dcytb, ya que tanto con Fe^{+3} como con Fe^{+2} observamos una disminución dramática en la captación de Fe en las células wtHFE. Por lo tanto, el blanco más probable de acción de HFE es el transportador apical DMT1.

4. Efecto de la sobreexpresión de HFE sobre la expresión del transportador DMT1.

Hasta ahora, nuestros resultados nos indican que HFE actuaría sobre el transportador DMT1 descrito por Gunshin y colaboradores (1997), por lo que determinamos sus niveles de expresión en las células control, wtHFE y HFE-H63D, encontrando una sobreexpresión de 3 a 4 veces con respecto a las células control. Los resultados de inhibición de DMT1 podrían entonces ser debidos a la síntesis de un transportador inmaduro con actividad disminuida. Por inmunodetección determinamos un peso molecular aparente de 67 kDa para el transportador DMT1-IRE, resultado que está de acuerdo con el peso molecular esperado deducido de la secuencia nucleotídica y con lo reportado por Sharp y colaboradores (2000). Para confirmar que la sobreexpresión de HFE en células Caco-2 producía un transportador DMT1 maduro, realizamos estudios de deglicosilación, observando una disminución de 2 a 3 kDa en el peso molecular del transportador, por lo que confirmamos que las células producían el transportador maduro de peso molecular de 67 kDa. El aumento de la expresión del transportador DMT1(IRE) en las células wtHFE, era esperado debido a los bajos niveles

de Fe intracelular y de LIP y a la regulación dada por el sistema IRP/IRE. Sin embargo, no eran predecibles en vista de la disminuida captación apical de Fe en estas células.

El ARNm de DMT1 se encontró aumentado en las células transfectadas con wtHFE y HFE-H63D comparadas con las células control. Para determinar si este aumento fue debido a una mayor vida media del ARNm del transportador, realizamos estudios de RT-PCR semicuantitativos y Northern blot de DMT1 en presencia de actinomicina D. Por ambas metodologías observamos que el ARNm de DMT1 en las células wtHFE y HFE-H63D presentaban una mayor vida media (2 veces) con respecto a las células control. Observaciones de Oates y colaboradores (2000) sugieren que tanto la proteína como el ARNm del transportador DMT1 son rápidamente degradados y que por tanto, la función del transportador DMT1 sería dependiente de la síntesis de novo del mismo.

La dramática disminución en el contenido de Fe intracelular de la célula y en la captación apical de Fe en las células que sobreexpresan wtHFE fuertemente sugiere que wtHFE es un modulador negativo del transportador DMT1. Esta característica se pierde en la proteína HFE con la mutación H63D, ya que estas células incorporan Fe en una forma muy similar a las células controles. Estos resultados entregan una explicación coherente para los altos niveles de absorción de Fe encontrado en los pacientes con HH, donde la función de HFE se pierde.

La idea que HFE forme un complejo con otras proteínas es perfectamente plausible. Claramente se ha demostrado la interacción con RTf y recientemente, Townsend and Drakesmith (2002), han postulado una segunda posibilidad de interacción de HFE, esta vez con Ireg1, el transportador basolateral de Fe que saca el Fe desde la célula. En su modelo, una alta saturación de Tf en un individuo normal, desplazaría el equilibrio hacia la unión de HFE a Ireg1 y baja saturación de transferrina desplazaría el equilibrio hacia la unión al RTf. En la HH, la ausencia de la proteína HFE desacoplaría a Ireg1, del efecto de una alta saturación de Tf en el paciente HH y por lo tanto se generaría una célula con una aumentada entrada de Fe y a la vez una aumentada salida del elemento, produciendo células intestinales con bajo Fe intracelular y un alto Fe sistémico.

Se ha propuesto que DMT1 también participa como el transportador de Fe endosomal en el ciclo endosomal de RTf-Tf, transportando el Fe endosomal hacia el citoplasma (Fleming et al., 1998; Fleming et al., 1999; Andrews et al., 1999; Tabushi et al., 2000). Los resultados presentados, permiten dar una interpretación a la disminución en la captación de Fe dependiente de Tf encontrada en células HeLa que sobreespresaban HFE, sin modificar las vía endo-exocítica del RTf (Roy et al., 1999; Corsi et al., 1999). Esta respuesta sugiere que HFE interferiría con la maquinaria endosomal involucrada en la entrega del Fe de la Tf al citosol, es decir, con el proceso de acidificación de las vesículas endocíticas, reducción del Fe^{+3} ó en el transporte de membrana de Fe^{+2} (Núñez et al., 1990). Nuestra observación que la sobreespresión de HFE también inhibe la incorporación apical de Fe^{+2} en células Caco-2 descartan un efecto de HFE sobre la

reductasa apical de Fe, dejando como candidatos de la inhibición al proceso de acidificación o al de transporte de Fe endosomal.

Fundamental para nuestra proposición que DMT1 es el blanco molecular de HFE, fue demostrar que DMT1 es el único ó principal transportador apical de Fe. Para confirmar esto, realizamos estudios con oligonucleótidos antisentidos de DMT1. La secuencia nucleotídica intrónica antisentido del transportador DMT1 5'CCTTTGACCCTCCCATTCTGCTC3', produjo una inhibición en la captación de Fe sobre un 80%. Este resultado sugiere fuertemente que el transportador DMT1, es el principal transportador apical de Fe.

5. DMT1 es un transportador de Cu

El resultado de una captación muy disminuida en las células wtHFE, nos llevó a plantearnos la posibilidad que no solamente el transporte de Fe podría estar alterado en estas células. Por ello, realizamos estudios de transporte de cobre, el cual podría ser transportado por DMT1. Las células wtHFE presentaron una captación disminuida de cobre similar a la reportada para Fe y corresponde a un 60% de disminución en la captación apical según lo reportado anteriormente (Arredondo et al., 2000). El transporte apical-basolateral, a pesar que fue menor, refleja solamente la menor disponibilidad del elemento. Estudios de transporte de Cu en presencia de oligonucleótidos antisentido contra DMT1, mostraron al igual que en el transporte de Fe, una inhibición del transporte de Cu de aproximadamente un 55%. Estos resultados de transporte, tanto de Fe como de Cu, nos indicó que el proceso de captación apical de metales se encuentra

alterado en estas células, como resultado de la sobreexpresión de HFE y nos sugiere que la HH no sería una alteración exclusiva del metabolismo del Fe. Las células HFE-H63D se comportaron como las células controles en lo que se refiere a captación y transporte de Cu. Estos resultados en su conjunto, nos sugieren que efectivamente la sobreexpresión de HFE en las células Caco-2 produce un efecto inhibitorio sobre la función del transportador DMT1. También demuestran que DMT1 es un transportador apical de Cu. La observación que HFE regula la captación de Cu es una observación original y nos permite una nueva visión del mecanismo regulatorio de su absorción intestinal.

6. Distribución de DMT1 y HFE por biotinylación y microscopía confocal.

En células con sobrecarga de Fe, el transportador DMT1 se localiza principalmente a nivel intracelular, sin embargo, en enterocitos deficientes en Fe, la proteína se localiza en la membrana apical (Tabuchi et al., 2000; Trinder et al., 2000; Canonne-Hergoux et al., 2001). Nuestros resultados muestran que junto con el aumento de la expresión de DMT1, las células wtHFE y HFE-H63D presentaron un cambio en la distribución del transportador DMT1. De una localización preferentemente en la membrana apical y escasa en la membrana basolateral en las células controles, cambio a una localización principalmente basolateral con un menor porcentaje en la membrana apical. Estos resultados sin embargo, no descartan una distribución intracelular del transportador. Esta distribución no fue suficiente para impedir niveles considerables del transportador en la membrana apical. Por lo que el cambio en la distribución del transportador DMT1 no sería la causa de la disminuida captación apical de Fe y otro(s)

mecanismo(s) deberían explicar la marcada disminución apical de Fe observada en las células wtHFE.

En células de epitelio intestinal, la proteína HFE se distribuye en la membrana basolateral y en compartimentos perinucleares (Parkkila et al., 1997b). Pero ¿qué sucede cuando la proteína HFE es sobreexpresada?. Explorando esta posibilidad, encontramos que en las células control, HFE es biotinilado desde la membrana apical, una clara indicación que HFE alcanza esta membrana. La proteína HFE en las células wtHFE presentó un cambio en la distribución por efecto de la sobreexpresión. Normalmente la proteína HFE, se ubica preferentemente en la membrana basolateral del enterocito, sin embargo, se observó que en las células que sobreexpresan HFE, la proteína se localizó principalmente en la membrana apical. Además, hubo un cambio en la distribución de HFE desde basolateral hacia zonas mediales de la célula, sin poder discriminar si esta localización es a nivel de la membrana plasmática o a nivel intracelular.

El enriquecimiento de la proteína HFE en la membrana apical, podría ser explicado por un mecanismo de transitos celular. Las células polarizadas expresan diferentes proteínas en sus superficie apical y basolateral, lo que refleja su capacidad para destinar las proteínas blancos a sus dominios de membrana y así realizar funciones especializadas en cada polo de la célula. El destinamiento de proteínas a la membrana apical depende de dos vías. Una vía directa desde el red trans Golgi y una vía indirecta o transitos que pasa temporalmente por la membrana basolateral (Taub, et al., 1993; Delgrossi, et al., 1997). En las células polarizadas Caco-2 se han descrito ambos

mecanismos (Le Bivic et al., 1990a y 1990b; Lanctot et al., 1995). Este mecanismo de transitosis posibilitaría que HFE interaccionara con DMT1 en la membrana apical inhibiendo su actividad. Por lo tanto, estudios conducentes a resolver esta posibilidad deberían ser realizados. Sin embargo, es importante destacar, que el cambio en la distribución apical/basolateral de DMT1 y HFE no explica en su totalidad el cambio en la actividad de captación apical de Fe.

7. Interacción entre la proteína HFE y DMT1.

Los resultados hasta ahora mostrados nos indican la posibilidad que la proteína wtHFE esté realizando alguna interacción con otras proteínas para complementar su función. Ya sabemos que HFE interacciona con el receptor para transferrina en la membrana basolateral. Esta interacción no sólo permite realizar su efecto inhibitorio de la captación basolateral de hierro a través del complejo RTf-Tf-Fe, sino que además, esta misma interacción le permite alcanzar compartimentos endosomales. Por otro lado, la sobreexpresión de wtHFE produjo un incremento de la proteína tanto a la membrana apical como a compartimentos intracelulares mediales. Por lo tanto, HFE y DMT1 pueden colocalizar ya sea en la membrana apical o en compartimentos endosomales y de esta forma HFE podría ejercer su efecto inhibitorio. Resultados preliminares de sedimentación en gradientes lineales de sacarosa, muestran una posible interacción entre HFE y DMT1. Se observó un complejo de aproximadamente 110 kDa el cual fue visible al inmunodetectar ya sea DMT1 o HFE.

En síntesis, nuestros resultados nos permiten postular, que además de la interacción HFE-RTf, se produce una interacción entre HFE-DMT1, que regula negativamente a DMT1. La ausencia de una proteína HFE funcional, produciría el desacople de la regulación negativa de HFE sobre DMT1 tanto a nivel de membrana apical como a nivel endosomal. Este desacople produciría una alta captación de Fe por parte del transportador DMT1 y de la salida del Fe desde el endosoma hacia el citoplasma. Como la etapa de incorporación apical es la más regulada en el proceso de absorción intestinal de Fe, la mayor incorporación conlleva entonces a una mayor transferencia de Fe al basolateral, produciendo una mayor absorción neta de Fe. Sin embargo, un efecto adicional de HFE sobre el transportador Ireg1 no puede ser descartado.

6. COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIONES.

Los hallazgos aquí presentados, indican que la sobreexpresión de HFE en células Caco-2 produce una marcada disminución en el transporte de Fe apical y resultando en una disminución en el contenido de Fe reactivo y en la concentración de Fe intracelular. Como consecuencia de esto, el número de receptores para transferrina y el transportador DMT1 aumentan y la concentración de Fn intracelular disminuye, específicamente por la acción reguladora del sistema IRP/IRE. A pesar de esto, el transporte apical de Fe se encontró significativamente disminuido. Encontramos que ninguno de los cambios observados en las células que sobreexpresan la proteína wtHFE, es decir, concentración intracelular de Fe disminuida, Fe reactivo dramáticamente disminuido, aumento de la actividad del sistema IRP e inhibición de la actividad de DMT1, fueron observadas en las células que sobreexpresan HFE-H63D. Una interpretación de estos resultados es que la proteína mutada presenta una pérdida de función. Probablemente, la proteína HFE-H63D pierde su capacidad para inhibir la actividad de DMT1. La inhibición del transporte de Fe apical explicaría la absorción intestinal de Fe aumentada encontrada en la HH y establece una nueva relación entre HFE y DMT1, una de las proteínas claves de la homeostasis de Fe.

De los tres posibles mecanismos de acción de HFE (Figura 23), solamente los mecanismo a): redistribución de HFE hacia la membrana apical, y c): activación de intermediarios de la actividad de HFE, podrían ser explicados por nuestros resultados.

El mecanismo *b*): inhibición de la destinación de DMT1 a la membrana apical por efecto de HFE no puede ser explicado, ya que el transportador DMT1 no disminuye su expresión apical por la presencia de HFE.

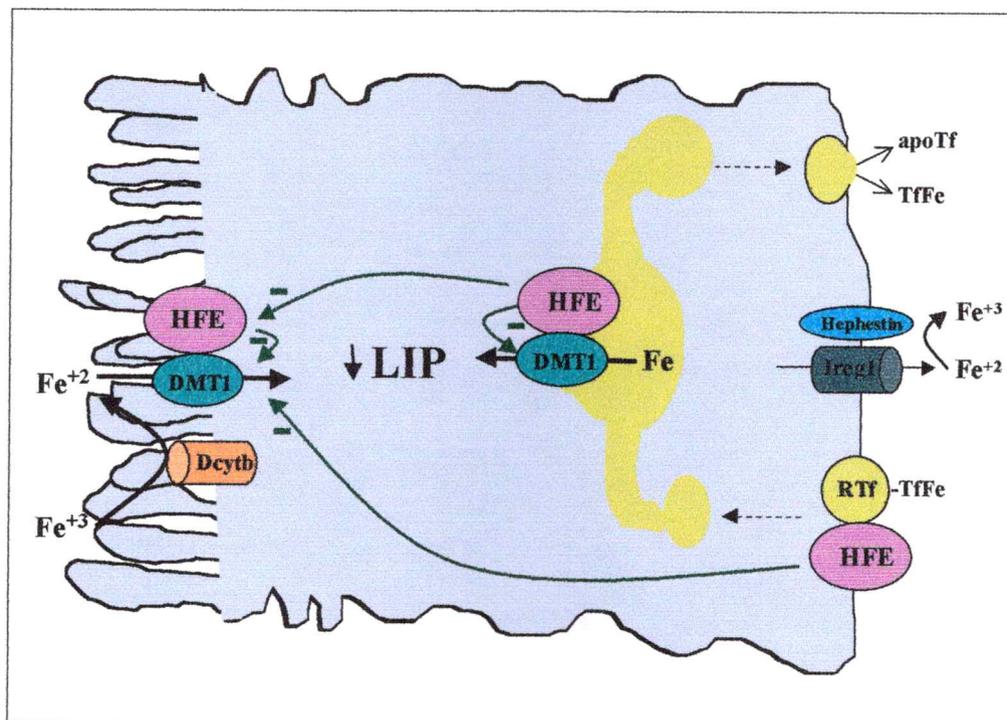
Dos resultados apoyan la hipótesis de interacción directa de HFE-DMT1. La primera es la distribución tanto de la proteína HFE como de DMT1. El evento que HFE se encuentre en la membrana apical posibilitaría una posible interacción con DMT1, sin descartar una interacción a nivel de compartimentos endosomales. El segundo fundamento lo observamos en la disminuida captación de cobre, el cual también es transportado por DMT1. Lo que nos sugiere que en la HH existiría una alteración global en la captación de metales trazas y por otro lado, apoya la tesis de una interacción de HFE con el transportador DMT1.

Sobre la base de los resultados obtenidos, postulamos el siguiente mecanismo de actividad para HFE (Figura 24). En individuos normales, HFE, por una asociación directa, regula negativamente la actividad del transportador apical DMT1. HFE además, se asocia al RTf en la membrana basolateral y es endocitado junto con el a compartimentos endosomales en donde interactúa con DMT1 regulando negativamente su actividad. El Fe recién internalizado, es entregado a la circulación a través del transportador de la membrana basolateral Ireg1 o es almacenado en la Fn. En el caso de un paciente con HH, la regulación dependiente de HFE se pierde y se produce un aumento en la captación de Fe por la membrana apical del enterocito y de la entrega del Fe endocitado por el complejo RTF-TF-Fe.

Figura 24: Modelo de la homeostasis de Fe en células de epitelio intestinal normal.

El Fe^{+3} de la dieta es reducido a Fe^{+2} por acción de la ferrireductasa Dcytb de la membrana apical del enterocito. Luego el Fe^{+2} es internalizado a la célula por medio del transportador DMT1. Otra vía de incorporación de Fe es a través de la endocitosis basolateral del complejo RTf-Tf-Fe. La proteína HFE silvestre en la membrana basolateral, disminuye la afinidad del RTf por Tf-Fe. Además, es endocitado junto al RTf, donde colocaliza con DMT1 en el sistema endosomal e inhibe negativamente su actividad. HFE también se distribuye en la membrana apical, regulando negativamente la actividad de DMT1.

En paciente con Hemocromatosis Hereditaria, la actividad reguladora negativa de HFE sobre DMT1 y RTf se pierde, lo que resulta en una captación apical de Fe y endocitosis basolateral de RTf-Tf-Fe aumentadas. Probablemente, la salida de Fe, a través del exportador basolateral Ireg1 también se encuentra aumentada.



7. BIBLIOGRAFIA

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

Alvarez, E., Gironés, N., and Davis, R. (1990). A point mutation in the cytoplasmic domain of the transferrin receptors inhibits endocytosis. *Biochem J.* 267: 31-35.

Alvarez-Hernández, X., Nichols, GM. and Glass, J. (1991) Caco-2 cell line: a system for studying iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim Biophys Acta.* 1070: 205-208.

Alvarez-Hernandez, X., Smith, M., and Glass, J. (1994) Regulation of iron uptake and transport by transferrin in Caco-2 cells, an intestinal cell line. *Biochim Biophys Acta.* 1192:215-222.

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

Andrews, N. (2000) The iron transport DMT1. *J Biochem Cell Biol.* 31: 991-994.

Arturson, P. (1991) Epithelial transport of drugs in cell culture: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *J Phar Sci.* 79: 476-82.

Arredondo, M., Orellana, A., Gárate, M., and Núñez, M. (1997) Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol.* 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36): G275-G280.

Arredondo, M., Uauy, R., and Gonzalez, M., (2000) Regulation of copper uptake and transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochim Biophys Acta.* 1474: 169-176.

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. and Núñez, M.T. (2001) HFE is a negative modulator of apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *FASEB J*, May, 2001.

Audus, K., Bartel, R., Hidalgo, I and Borchardt, R. (1990) The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmac Res.* 7: 435-51

Banerjee, D., Flanagan, P., Cluett, J., Valberg, L. (1986) Transferrin receptor in the gastrointestinal tract. Relationship to body iron stores. *Gastroenterology.* 91: 861-69.

- Barton, J., Sawada-Hirai, R., Rothenberg, B., Acton, R. (1999) Two novel missense mutations of the HFE gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol Dis.* 25: 147-55.
- Beiner, H. and Kennedy, M. (1993) Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.* 7: 1442-49.
- Bennett, M., Lebron, J., Bjorkman, P. (2000) Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature.* 403: 46-53.
- Beutler, E. (1998) Targeted disruption of the HFE gene. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95: 2033-2034.
- Brown, E., Dubach, R. and Moore, C. (1958) Studies in iron transportation and metabolism. XI. Critical analysis of mucosal block by large doses of inorganic iron in human subjects. *J Lab & Clin Med.* 52(3): 335-55.
- Burdo, J., Menzies, S., Simpson, J., Garrick, L., Garrick, M., Dolan, K., Haile, D., Beard, J. (2001) Distribution of divalent metal transport 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res.* 66(6): 1198-1207.
- Cairo, G., Recalcati, S., Montosi, G., Castrusini, E., Conte, D. and Pietrangelo, A. (1997) Inappropriately high iron regulatory activity in monocytes of patients with genetic hemochromatosis. *Blood.* 89: 2546-2553.
- Caltagirone A, Weiss G, Pantapoulos K. (2001) Modulation of iron metabolism by hydrogen peroxide. Effect of H₂O₂ on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. *J Biol Chem.* 276:19738-45.
- Canonne-Hergoux, F., Zhang, A., Ponka, P., Gros, P. (2001) Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT2) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood.* 98(13): 3823-30.
- Carlson, J. and Olsson, S. (2001) Hereditary hemochromatosis and iron metabolism. *JIFCC.* 13(2): 1-8. <http://www.ifcc.org/ejifc/vol13no2/1301200103.htm>.
- Casey, J., Koeller, D., Ramin, V., Klausner, R. and Harford, J. (1989) Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *The EMBO J.* 8: 3693-99.
- Cazzola, M. and Skoda, R. (2000) Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood.* 95: 3280-3288.

Chan, R., Seiser, Ch., Schulman, H., Kühn, L. and Ponka, P. (1994) Regulation of transferrin receptor mRNA expression. *Eur J Biochem.* 220: 283-92.

Collawn, J., Stangel, M., Kühn, L. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, 63: 1061-1072.

Conrad, M. and Crosby, W. (1963) Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption. *Blood.* 22: 406-15.

Corsi, B., Levi, S., Cozzi, A., Corti, A., Altimare, D., Albertini, A. and Arosio, P. (1999) Overexpression of the hereditary hemochromatosis protein, HFE, in HeLa cells induces an iron-deficient phenotype. *FEBS Lett.* 22: 149-152.

Crichton, R and Ward, R. (1991) Iron metabolism-New perspectives in view. *Biochemistry.* 31: 11255-11264.

Delgrossi, M., Breuza, L., Mirre, Ch., Chavier, P. and Le Bivic, A. (1997) Human syntaxin 3 is localized apically in human intestinal cells. *J. Cell. Sci.* 110: 2207-2214.

De Silva, D., Askwith, C. and Kaplan, J. (1996) Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiological Reviews.* 76: 31-47.

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

Drakesmith, H and Townsend, A. (2000) The structure and function of HFE. *BioEssays.* 22: 595-598.

Drapier, JC., Hirling, H., Wietzerbin, J., Kaldy, P., Kuhn, LC. (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J.* 12: 3643-3649.
Egyed, A. (1988) Carrier-mediated iron transport through erythroid cell membrane. *Brit J Haemat.* 68: 483-86.

Dupic F, Fruchon S, Bensaid M, Borot N, Rodosailjevic M, loreal O et al. (2002) inactivation of the hemochromatosis gene differentially regulates duodenal expression of iron-related mRNAs between mouse strain. *Gastroenterology.* 122: 745-51.

Eisenstein, R., Tuazon, P., Schalinske, K., Anderson, S. and Traugh, J. (1993) Iron-responsive element-binding protein: Phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem.* 268: 27363-70.

Eisenstein, R. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian Fe metabolism. *Annu Rev Nutr.* 20: 627-62.

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

Fairweather-Tait, S. and Wright, A. (1984) The influence of previous iron intake on the estimation of bioavailability of Fe from a test meal given to rats. *Br J Nutr.* 51: 185-91.

Fairweather-Tait, S., Swindell, TE. and Wright, JA. (1985) Further studies in rats on the influence of previous iron intake on the estimation of bioavailability of Fe. *British J Nutr.* 54: 79-86.

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

Feder, J., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V., and Mapa, F. (1997) The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 272(22): 14025-14028.

Feder, JN., Penny, DM., Irrinki, A., Lee, VK., Lebron, JA., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, PJ., and Schatzman, RC. (1998) The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 1472-1477.

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

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

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

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

Fleming, MD., Migas, MC., Zhou, XY., Jiang, J., Britton, RS., Brunt, EM., Tomatsu, S., Waheed, A., Bacon, BR. and Sly, WS. (1999) Mechanisms of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transported DMT1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 3143-3148.

Fleming, R. and Sly, W. (2002) Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol.* 64: 663-80.

Fogh, J., Wright, W. and Loveless, J. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J of National Cancer Institute.* 58: 209-214

Gárate, M. and Núñez, MT. (2000) Overexpression of the ferritin iron-responsive element decreases the labile iron pool and abolishes the regulation of iron absorption by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Biol Chem.* 275(3): 1651-1655.

Garcia, MN., Flowers, C. and Cook, JD. (1996) The Caco-2 cell system can be used as a model to study food iron availability. *J Nutr.* 126: 251-258.

Gehring N, Hentze M, Pantopoulos K. (1999) Inactivation of both RNA binding and aconitase activities of iron regulatory protein-1 by quinone-induced oxidative stress. *J Biol Chem* 274: 6219-25.

Girones, N., Alvarez, E., Seth, A., Lin, I., Latour, D. (1991). Mutational analysis of the cytoplasmic tail of the human transferrin receptor. *J Biol Chem.* 266(28): 19006-19012.

Goossen, B., Caughman, S., Harford, J., Klausner, R., Hentze, M. (1990) Translational repression by a complex between the iron-responsive element of ferritin mRNA and its specific cytoplasmic binding protein is position-dependent in vivo. *EMBO J.* 9: 4127-33.

Gray, N. and Hentze, M. (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNA. *EMBO J.* 13: 3882-91.

Griffiths, W., Sly, W., Cox, T. (2001) Intestinal iron uptake determined by divalent metal transport is enhanced in HFE-deficient mice with hemochromatosis. *Gastroenterology.* 120: 1420-1429.

Gross, C., Irrinki, A., Feder, J., Enns, C. (1998) Co-Trafficking of HFE, a non-classical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem.* 273: 22068-22074.

Gruenheid, S., Canone-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackman, D., Grinstein, S. Gross, P. (1999) The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med.* 189: 831-841.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, MF., Boron, WF., Nussberger, S., Gollan, JL., and Hediger MA. (1997) Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal ion transporter. *Nature.* 388: 482-488.

Guo, B., Brown, F., Phillips, J., Yu, Y. and Leibold, E. (1995a) Characterization and expression of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem.* 270: 16529-35.

- Guo, B., Brown, F., Phillips, J., Yu, Y. and Leibold, E. (1995b) Iron Regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element binding protein without aconitase activity. *J Biol Chem.* 270: 16529-35.
- Haile, D., Hentze, M., Rouault, T., Hartford, M and Klausner, R. (1989) Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA element. *Mol Cell Biol.* 9:5055-5061.
- Haile, D., Rouault, T., Tang, C., Chin, J., Harford, J. (1992a) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(16): 7536-40.
- Halleux, C. and Schneider, Y. (1991) Iron Absorption by intestinal epithelial cells: 1. Caco-2 cells cultivated in serum-free medium, on polyethyleneterephthalate microporous membranes, as an in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol.* 27A: 293-302.
- Hamilton, K., Stallibrass, L., Hassan, I., Jin, Y., Halleux, C. (1994) The transport of two iron chelators, desferrioxamine B and L1, across Caco-2 monolayers. *Brit J Haematol.* 86: 851-857.
- Henderson, B., Seiser, Ch. and Kühn, L. (1993) Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron-responsive element. *J Biol Chem.* 273:27-34.
- Hentze, M., Rouault, T., Harford, J. and Klausner, R. (1989) Oxidation-Reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-Protein interaction. *Science.* 244: 357-59.
- Huebers, H., Huebers, E., Csiba, E., Rummel, W. and Finch, Cl. (1983) The significance of transferrin for intestinal iron absorption. *Blood.* 61(2): 283-90.
- Hughes, R., Smith, T., Hesp, R., Hulme, B. (1992) Regulation of iron absorption in iron loaded subjects with end stage renal disease: effects of treatment with recombinant human erythropoietin and reduction of iron stores. *Br J Haematology.* 82: 445-54.
- Hughson, E. and Hopkins, C. (1990) Endocytic pathways in polarized Caco-2 cells. Localization of a compartment accessible from both apical and basolateral surfaces. *J Cell Biol.* 110:337-348.
- International Nutritional Anemia Consultative Group. (1979) Iron deficiency in infancy and childhood. A report of the International Nutritional Anemia Consultative Group. INACG. Washington: Nutrition Foundation.
- Kakhlon, O., Gruenbaum, Y., Cabantchik, I. (2001) Repression of the heavy ferritin chain

increases the labile iron pool of human K562. *Biochem J.* 356: 311-316.

Kim, H., Klaasner, R. and Rouault, T. (1995) Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by *in vitro* RNA binding for two iron-responsive element-binding proteins, IRP1 and IRP2. *J Biol Chem.* 270: 4983-86.

Klaasner, R.D., Rouault, T.A. and Hartford, J.B. (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell.* 72: 19-28.

Knopf M and Solioz M. (2002) Characterization of a cytochrome b (558) ferric/cupric reductase from rabbit duodenal brush border membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:220-5.

Kühn, L. and Hentze, M. (1992) Coordination of cellular iron metabolism by post-transcriptional gene regulation. *J Inorg Biochem.* 47(3-4): 183-95.

Kuo, HJ., Maslen, C., Keene, D. and Glanville, R. (1997) Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J Biol Chem.* 272: 26522-26529.

Lanctot, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G and Crine, P. (1995) Direct targeting of neural endopeptidase (EC 3.4.24.11) to the apical cell surface of transfected LLC-PK1 cells and unpolarized secretion of its soluble form. *Biochem. J.* 305, 165-171

Le Bivic, A., Sambuy, Y., Mostov, K. and Rodriguez-Boulan, E. (1990a) Vectorial targeting of an endogenous apical membrane sialoglycoprotein and uvomorulin in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 110: 1533-1539

Le Bivic, A., Quaroni, A., Nichols, B. and Rodriguez-Boulan, E. (1990b). Biogenetic pathway of plasma membrane proteins in Caco-2 cells, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell. Biol.* 111: 1351-1361.

Lebron, JA., Bennett, MJ., Vaughn, DE., Chirino, AJ., Snow, PM., Mintier, GA., Feder, JN., and Bjorkman, PJ. (1998) Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell.* 93: 113-123.

Lebron, JA. and Bjorkman, P. (1999a). The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. *J Mol Biol.* 289: 1109-1118.

Lebron, JA., West, A. and Bjorkman, P. (1999b) The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol.* 294: 239-245.

Lee, PL., Gelbart, T., West, C., Halloran, C., Beutler, E. (1998) The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol. Dis.* 24: 199-215.

Leibold, EA. and Munro, HN. (1988) Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2171-2175.

Leibold, E. and Guo, B. (1992) Iron-dependent regulation of ferritin and transferrin receptor expression by the iron-responsive element binding protein. *Ann Rev Nutr.* 12: 345-68.

Levine, J. and Seligman, P. (1984) The ultrastructural immunocytochemical localization of transferrin receptor (TFR) and transferrin (TF) in the gastrointestinal tract in man (abstr). *Gastroenterology.* 86: 1161.

Levy, J., Montross, L., Cohen, D., Fleming, M., Andrews, N. (1999) The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood.* 94: 9-11.

Lowry, O., Rosebrough, N. and Farr, A. (1951) Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-75.

Mahraoui, L., Bousset, M., Dissaulx, E., Darmoul, D., and Zweibaun, A. (1992) Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine and colon. *Gastrointest Liver Physiol.* G312-G318.

Mascotti, D., Rup, D. and Thach, R. (1995) Regulation of Iron Metabolism: Translational effects mediated by iron, heme, and cytokines. *Ann Rev Nutr.* 15: 239-61.

Meyron-Holtz, E., Vaisman, B., Cabantchik, I., Fibach, E., Rouault, T., Hershko, C., Konijn, A. (1999) Regulation of intracellular iron metabolism in human erythroid precursors by internalized extracellular ferritin. *Blood.* 94: 3205-3211.

Morgan, E. (1988) Membrane transport of non-transferrin-bound iron by reticulocytes. *Biochim et Biophys Acta.* 943: 428-39.

Mullner, E., Neupert, B. and Kühn, C. (1989) A specific mRNA binding factor regulates the Iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell.* 58: 373-82.

Mullner, E., Rothenberger, S., Muller, A. and Kuhn, L. (1992) In vivo and in vitro modulation of the RNAm binding activity of iron regulatory factor. Tissue distribution and effects of cell proliferation, iron levels and redox state. *Eur. J. Biochem.* 208: 597-605.

Mura, C., Raguene, O., Ferec, C. (1999) HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implications in mild form of hemochromatosis. *Blood*. 93: 2505-5.

Núñez, MT., Gaete, V., Watkins, A., Glass, J. (1990) Mobilization of iron from endocytic vesicles. *J Biol Chem*. 265: 6688-6692.

Núñez, MT., Escobar, A., and Ahumada, A., (1992) Gonzalez-Sepulveda, M. Sealed reticulocyte ghosts. An experimental model for the study of Fe²⁺ transport. *J Biol Chem* 267: 11490-94.

Núñez, MT., Alvarez, X., Smith, M., Tapia, V. and Glass, J. (1994) Role of redox systems on Fe³⁺ uptake by transformed human intestinal epithelia (Caco-2) cells. *Am J Physiol*. 267(Cell Physiol. 32): C1582-C1588.

Núñez, MT., Tapia, V. and Arredondo, M. (1996) Intestinal epithelia (Caco-2) cells acquire iron through the basolateral endocytosis of transferrin. *J Nutr*. 126: 2151-2158.

Oates, P., Trinder, D. and Morgan EH. (2000) Gastrointestinal function, divalent metal transporter-1 expression and intestinal iron absorption. *Eur J physiol*. 440: 496-502.

Ozenberg, B. and Young K. (1995) Functional interaction of ligand and receptors of the hematopoietic superfamily in yeast. *Mol Endocr*. 9: 1321-1329.

Pantopoulos, K., Weiss, G., and Hentze, MW. (1996) Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol*. 16: 3781-3788.

Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R., Bacon, B., Zhou, X., Tomatsu, S., Fleming, R. and Sly, W. (1997a) Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. USA*. 94: 13198-13202.

Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R., Feder, J., Tsuchihashi, Z., Schatzman, RC., Bacon, BR. and Sly, W. (1997b) Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.; 94: 2534-2539.

Parkkila, S, Parkilla, A., Waheed, A., Briton, R., Zhou, X. (2000) Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes. *Haematologica*. 85: 340-45.

Parmeley, R., Barton, J. and Conrad, M. (1985) Ultrastructural Localization of transferrin, transferrin receptor and iron binding sites in human placental and duodenal microvilli. *Br J Heamatol*. 60: 81-9.

Peters, T., Raja, K., Simpson, R. and Snape, S. (1988) Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Ann NY Acad Sci.* 526: 141-47.

Peterson, M. and Mooseker, M. (1993a) An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell-contact induced brush border assembly in Caco-2_{BBE} cells. *J Cell Sci.* 105: 445-60.

Peterson, M., Bement, W., Mooseker, M. (1993b) An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. II. Changes in expression and localization of brush border proteins during cell contact-induces brush border assembly in Caco-2_{BBE} cells. *J Cell Sci.* 105: 461-72.

Pietrangelo, A., Rocchi, E., Casalgrandi, G., Giampiero, R. Ferrari, A. (1992) Regulation of transferrin, transferrin receptor and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterology.* 102: 802-9.

Piperno, A., Arosio, C., Fossati, L., Vigano, M., Trombini, P. et al. (2000) Two novel nonsense mutation of HFE gene in five unrelated Italian patients with hemochromatosis. *Gastroenterology.* 119: 441-45.

Pitt, A., Gabriels, J., Badmington, F., Mcdowell, J., Gonzalez, L., Waugh, M. (1987) Cell culture on a microscopically transparent microporus membrane. *Biotechniques.* 5: 162-70.

Pointon, J., Wallace, D., Merryweather-Clarke, A., Robson, K. (2000) Uncommun mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. *Genet Test.* 4: 151-61.

Ramalingam, TS., West, AP., Lebron, JA., Nangiana, JS., Hogan, TH., Enns, CA. and Bjorman, PJ. (2000) Binding of transferrin receptor is required for endocytosis of HFE and regulation of iron homeostasis. *Nature Cell Biol.* 2: 953-957.

Richardson, DR. 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.

Riedel, H., Muckenthaler, M., Gehrke, S., Mohr, I., Brennan, K., Herrmann, T., Fitscher, B., Hentze, M. and Stremmel, W. (1999) HFE down-regulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells. *Blood.* 94: 3915-3921.

Rouault, T., Hentze, M., Haile, D., Harford, J. and Klausner, R. (1989a) The iron responsive element binding protein: purification of a regulatory RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 5768-5772.

Rouault, T., Hentze, M., Caughman, S. Harford, J., Klausner, R. (1989b) Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA.

Science. 241: 1207-1210.

Rouault, T., Stout, C., Kaptain, S., Hartford, J., Klausner, R. (1991) Structural relationship between an iron regulated RNA binding protein (IRE-BP) and aconitase. Functions implications. *Cell*. 64: 881-883.

Rouault, T., Haile, D., Downey, W., Philpott, C., Tang, C., and Samaniego, F. (1992) An iron-sulfur cluster plays a novel regulatory role in the iron responsive element binding protein. *BioMetals*. 5: 131-40.

Roy, CN., Penny, DM., Feder, JN. and Enns, CA. (1999) The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem*. 274: 9022-9028.

Roy, C. and Enns, C. (2000) Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood*. 96: 4020-4027.

Roy, CN., Blemings, K., Deck, K., Davies, P., Anderson, E., Eisenstein, R. and Enns, C. (2002). Increased IRP1 and IRP2 binding activity accompanies a reduction of the labile iron pool in HFE-expressing cells. *J Cell Physiol*. 190: 218-226.

Salter-Cid, L., Brunmark, A., Li, Y., Leturcq, D., Peterson, P. (1999) Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: implications for cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96: 5434-39.

Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T. and Klausner, R. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein. Iron regulatory protein 2. *J Biol Chem*. 269: 30904-30910.

Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2^o Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanchez, M., Queralt, R., Brugera, M., Rodes, J., Oliva, R. (1998) Cloning, sequencing and characterization of the rat hereditary hemochromatosis promoter: comparison of the human, mouse and rat HFE promoter region. *Gene*. 225: 77-87.

Santos, M., Schilham, M., Rademarkers, L., Marx, J., Sousa, M., and Clevers, H. (1996) Defective iron homeostasis in β 2-Microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J Exp Med*. 184: 1975-1985.

Schalinske, KL. and Eisenstein, RS. (1996) Phosphorylation and activation of both iron regulatory proteins 1 and 2 in HL-60 cells. *J Biol Chem*. 271: 7168-7176.

Sharp, P., Tandy, S., Spurgeon, K., Williams, M. and Srail, SK. (2000) Iron-dependent regulation of DMT1 transporter expression in Caco-2 cells. *J Physiol*. 572P:36P.

- Simpson, R., Raja, K. and Peters, T. (1985). Fe⁺³ transport by brush-border membrane vesicles isolated from normal and hypoxic mouse duodenum and ileum. *Biochem Biophys Acta.* 814: 8-12.
- Tabushi, M., Yoshimori, T., Yamagushi, K., Yoshida, T., Kishi, F. (2000) Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 275(29): 22220-22228.
- Tang, C., Chin, J., Harford, J., Klausner, R. and Rouault, T. (1992) Iron regulates the activity of the iron-responsive element binding protein without changing its rate of synthesis or degradation. *J Biol Chem.* 267: 24466-24470.
- Tapia, V., Arredondo, M. and Núñez, MT. (1996) Regulation of iron absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status. *Am J Physiol.* 271(34): G443-G447.
- Taub, M. and Shen, W. (1993) Regulation of pathways within cultured epithelial cells for the transcytosis of a basal membrane-bound peroxidase-polylysine conjugate. *J. Cell. Sci.* 106: 1313-1321.
- Tchernitchko, D., Bourgeois, M., Martin, M., Beaumont, C. (2002) Expression of the two mRNA isoforms of the iron transport Nramap2/DMT1 in mice and junction of the iron responsive element. *Biochem J.* 363: 449-55.
- Theil, E. (1993) The IRE (iron regulatory element) family: structures which regulate mRNA translation or stability. *Biofactors.* 4(2): 87-93.
- Topham, R. Eads, C. and Butler, B. (1992) Alterations in the mucosal processing of iron in response to very-short-term dietary iron depletion and repletion. *Biochem J.* 284: 877-84.
- Townsend, A. and Drakesmith, H. (2002) Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet.* 359: 786-790.
- Trinder, D., Oates, PS., Sadleir, CT. and Morgan, EH. (2000) Localization of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut.* 46:270-276.
- Tsuji, Y., Ayaki, H., Whitman, S., Morrow, C., Torti, S., Torti, F. (2000) Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 20: 5818-5827.

Tu, G., Cao, Q., Zhou, F. and Israel, Y. (1998) Tetranucleotide GGGA motif in primary RNA transcripts. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25125-131.

Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X., Tomatsu, S. and Feder, J. (1997) Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with β_2 -microglobulina, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12384-12389.

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

Wahhed A., Grubb J., Zhou X., Tomatsu Sh., Fleming R., Costaldi M., Britton R., Bacon B., and Sly W. (2002) Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 3117-3122.

Walden, W., Patino, M. and Gaffield, L. (1989) Purification of a specific repressor of ferritin mRNA translation from rabbit liver. *J Biol Chem.* 264: 13765-69.

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

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

White, S., Hatton, S., Siddiqui, M., Parker, C. (1998) Analysis of the structural requirements for lysosomal membrane targeting using transferrin receptor chimeras. *J Biol Chem.* 273(23): 14355-14362.

Wien, E. and Van Campem, D. (1991) Mucus and iron absorption regulation in rats fed various levels of dietary iron. *J Nutr.* 121: 92-100.

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

Wright, A., Southon, S. and Fairweather, T. (1989) Measurement of non-haem iron absorption in non anemic rats using ^{59}Fe : Can the Fe content of duodenal mucosal cells cause lumen or mucosal radioisotope dilution, or both, thus resulting in the underestimation of Fe absorption?. *Br J Nutr.* 62: 719-27.

Zheng, H., Bhavsar, D., Volz, A., Ziegler, A. and Drysdale, J. (1994) Exclusion of ferritins and iron-responsive elements (IRE)-binding proteins as candidates for the hemochromatosis gene. *Hum Genet.* 94: 159-164.

Zhou, X., Tomatzu, S., Fleming, R., Parkkila, S., Waheed, A. and Jiang, J. (1998) HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95: 2492-2497.

Zoller, H., Pietrangelo, A., Vogel, W. & Weiss, G. (1999) Duodenal metal-transporter (DMT-1, NRAMP-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet* 353, 2120–2123.

Zoller, H., Koch, R. O., Theurl, I., Obrist, P., Pietrangelo, A., Montosi, G., Haile, D. J., Vogel, W. & Weiss, G. (2001) Expression of the duodenal iron transporter divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology* 120, 1412–1419.