

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Estudio del ensamblaje de la ferritina *ex vivo* en el intestino de larva de
Drosophila melanogaster”**

T E S I S

Que presenta

IBT. ANNA KAREN HERNÁNDEZ GALLARDO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. Fanis Missirlis

Ciudad de México

Febrero, 2020

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de los Metales en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Fanis Missirlis y con el apoyo del CONACyT a través de la beca No. 615674.

Agradecimientos

Al CONACyT por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Fanis Missirlis por darme la oportunidad de pertenecer al laboratorio de Biología de los Metales. Por todo el tiempo invertido, su guía y consejo durante este trabajo de investigación.

A los Dres. María del Refugio García Villegas y Dr. Edgar Morales Ríos por las aportaciones realizadas para enriquecer este trabajo de investigación.

A los Dres. del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias por sus enseñanzas.

A mis compañeros de Laboratorio: Carlos, Isa, Johana, Rosa Lilia y Erika así como a Beatriz Osorio, por su valioso apoyo, comentarios para enriquecer el trabajo de investigación, por los momentos compartidos y por sus enseñanzas.

A Ross por ser mi compañera en este trayecto, por su apoyo y cariño incondicional en los momentos más difíciles. Gracias también por su constante motivación para hacer de mí una mejor persona.

A mis compañeros de generación y futuros colegas por la amistad y el cariño brindado.

Resumen

Las ferritinas son proteínas ubicuas altamente conservadas que almacenan hierro en su cavidad. Aunque el hierro es componente esencial de muchas enzimas en las células, en su forma libre cataliza la generación de especies reactivas del oxígeno causando daño a macromoléculas. Las ferritinas regulan los niveles de hierro intracelular al secuestrarlo y almacenarlo en su interior. La ferritina es un complejo multimérico que, en el caso de *Drosophila melanogaster*, se ensambla con 12 subunidades H y 12 subunidades L. Acercamientos previos que estudiaron el mecanismo de ensamblaje de ferritina se basaron en incorporar una etiqueta fluorescente en la subunidad H y sugirieron que en un evento previo a la formación del complejo las subunidades H y L se encuentran en compartimentos subcelulares distintos. Además, el sistema Gal4-UAS usado anteriormente para dirigir la transcripción de mCherry-Fer2LCH no funcionó por el retraso temporal en la expresión de la subunidad L etiquetada con mCherry tras el estímulo con hierro. Por esta razón en esta tesis de maestría proponemos el diseño de una nueva herramienta genética para construir la cepa *mKate2-Fer2LCH*, en donde la proteína fluorescente mKate2 se incorpore a la secuencia endógena del gen Fer2LCH por la técnica de edición CRISPR-Cas9. Así lograremos que ambas proteínas etiquetadas se traduzcan simultáneamente. Recibimos en el laboratorio las moscas transgénicas inyectadas con el plásmido donador que contenía la inserción y realicé experimentos para verificar: 1) La inserción de mKate en el locus de Fer2LCH y 2) La generación de complejos de ferritina fusionados con la proteína roja fluorescente. Con los experimentos se determinó que los complejos producidos por las moscas mKate2-Fer2LCH eran complejos endógenos. Por ello se mandó a secuenciar la región modificada de estas moscas. Los resultados de la secuenciación indicaron que en la región N-terminal el marco de lectura de Fer2LCH está mutada y algunos aminoácidos se sustituyeron por otros que no aparecen en la secuencia endógena. En conclusión se optó por realizar más inyecciones de embriones con la finalidad de aumentar la probabilidad de lograr una correcta inserción en el locus endógeno, pues esta herramienta nos permitirá estudiar con mayor detalle la cooperación y tráfico entre subunidades antes de formar parte del complejo.

Abstract

Ferritins are highly conserved ubiquitous proteins that store iron inside their cavity. Although iron is an essential component of enzymes in cells, free iron ions catalyze the generation of reactive oxygen species (ROS) via the Fenton reaction causing oxidative damage to macromolecules. Ferritins regulate intracellular iron levels by sequestering and storing the iron. *Drosophila* ferritin is a multimeric complex assembled with 12 H subunits and 12 L subunits. Previous approaches that studied the mechanism of ferritin assembly by incorporating a fluorescent label in the H subunit suggested that prior to complex formation both subunits are found in different subcellular compartments. Moreover, the Gal4-UAS system used to express mCherry-Fer2LCH failed to incorporate these subunits into ferritin due to a temporary delay in the expression of the L subunit labeled with mCherry after iron-dependent induction. For this reason, in this thesis I propose the design of a new genetic tool, the fly strain *mKate2-Fer2LCH*, where the mKate2 fluorescent protein is incorporated into the endogenous sequence of the *Fer2LCH* gene using the CRISPR-Cas9 editing technique with the ultimate goal to visualize both labeled proteins translated simultaneously. I received the transgenic flies injected with the donor plasmid containing the insert. Subsequently, experiments were carried out to verify: 1) The insertion of mKate2 into the *Fer2LCH* locus and 2) The generation of ferritin complexes fused with the mKate2 red fluorescent protein. The complexes produced by *mKate2-Fer2LCH* flies were, however, the endogenous ferritin complexes. Therefore, the *Fer2LCH* locus of the genome-edited flies was subcloned and sequenced. Sequencing indicated that in the N-terminal region the open reading frame of *Fer2LCH* is modified and some amino acids were replaced by others that do not appear in the endogenous sequence. In conclusion, we chose to perform more embryo injections in order to increase the probability of achieving the correct insertion in the endogenous locus, as this tool will allow us to study in greater detail the cooperation and trafficking between subunits before the assembly of the complex.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 La importancia del hierro en la biología	7
1.2 Absorción de Hierro intestinal en mamíferos	8
1.3 Absorción de Hierro intestinal en insectos.	10
1.4 Ferritina: Estructura, Función y Regulación	12
1.5 Ferritina en insectos	19
2. ANTECEDENTES	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo General.....	35
5.2 Objetivos Específicos	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1 Cepas de <i>Drosophila</i>	36
6.2 Geles de acrilamida en condiciones no reductoras.....	36
6.3 Imágenes por microscopía.	37
6.4 Extracción de ADN	37
6.5 Reacciones de PCR.....	38
6.6 Reacción de ligación.	38
6.7 Transformación Bacteriana.	39
7. RESULTADOS	39
7.1 Curso temporal de la inducción de ferritina en la parte media del intestino de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
7.2 Diseño de la construcción mKate2-Fer2LCH por la técnica de edición CRISPR-Cas9. 41	
7.3 Verificación de la inserción de mKate2 en el locus de Fer2LCH.....	44
7.4 Eliminación del gen <i>mini-white</i> del locus <i>Fer2LCH</i>	45
7.5 Identificación de complejos de ferritina fusionados.....	45
7.6 Secuenciación	47
8. DISCUSIÓN.....	52
9. CONCLUSIONES	55
10. REFERENCIAS	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La importancia del hierro en la biología

El hierro es un micronutriente esencial para el desarrollo de la gran mayoría de organismos en la tierra, pues es componente integral de procesos biológicos vitales en las células, por ejemplo: la unión y distribución de oxígeno a los tejidos (Solomon et al., 2016; Jensen et al., 2009) la diferenciación y crecimiento celular (Yoon et al., 2017), el metabolismo lipídico (Rockfield et al., 2018) la respiración celular, la síntesis del ADN (Marelja, et al., 2018) etc. Es un metal de la serie de transición con orbitales *d* vacíos, por lo que puede existir en diferentes estados de oxidación. Entre los más comunes se encuentran Fe^{2+} y Fe^{3+} . Esta fluctuación en el estado de oxidación permite que el hierro participe en la transferencia de electrones vía reacciones óxido-reducción. Por su abundancia en la tierra y sus propiedades redox, los átomos de hierro fueron incorporados en procesos biológicos muy temprano en el desarrollo evolutivo (Martin Baross et al., 2008; Outten y Theil, 2009)

Los cuatro tipos de proteínas en las que el hierro se encuentra presente son: proteínas que poseen el grupo hemo (Poulos, 2014) (e.g. hemoglobinas, mioglobinas, peroxidasas, catalasas, citocromos), proteínas con clústeres hierro-azufre (Paul y Lill, 2015) (e.g. NADH deshidrogenasas, hidrogenasas, coenzima Q, citocromo C reductasas, succinato deshidrogenasas, nitrogenasas) proteínas con centro de hierro mono nuclear (Abu-omar, Loaiza, y Hontzeas, 2005) (e.g. catecol dioxigenasas, enzimas α -cetoácido- dependientes, hidroxilasas dependientes de pterina) y proteínas di nucleares (e.g. ferritinas, hemeritinas, rubreritinas, ribonucleotido reductasas) que no poseen un grupo hemo ni clústeres hierro-azufre (Hentze et al., 2010)

Aun cuando el hierro es fundamental para los organismos también es toxico al reaccionar con metabolitos del oxígeno (e.g. superóxido, peróxido de hidrogeno), pues se generan radicales hidroxilos altamente reactivos que ocasionan peroxidación de lípidos, oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos, daño al DNA. En las células mantener la

homeostasis del hierro es vital para asegurar su supervivencia, esta se logra a través de la regulación de los niveles de hierro sistémico e intracelular.

1.2 Absorción de Hierro intestinal en mamíferos

La absorción de hierro se define como el transporte desde la luz intestinal hacia la circulación a través de los enterocitos. El hierro proviene de la dieta en forma de hierro hemínico y hierro inorgánico. La absorción de ambos se realiza principalmente en el duodeno y el yeyuno proximal (Mackenzie et al., 2008). El hierro hemínico, por ser de naturaleza hidrofóbica puede atravesar las membranas lipídicas por difusión pasiva, sin embargo se ha demostrado que el transportador de folatos acoplado a protones HCP1 localizado en la membrana apical, media también el ingreso del complejo hierro-protoporfirina a los enterocitos duodenales (Blanc et al., 2019; Shayeghi et al., 2005). Al interior de la célula el hemo es catabolizado por la hemoxigenasa HO1 en el puente alfa-metileno, para generar CO_2 , Fe^{2+} y biliverdina (Yoshida y Migita, 2000) El hierro liberado ingresa a una vía común con el hierro inorgánico y la biliverdina se convierte en bilirrubina a través de la biliverdina reductasa (Rafnin et al., 1974)

Por otro lado, la mayoría del hierro dietético inorgánico ingresa al tracto gastrointestinal en forma de hierro férrico pues a pH fisiológico el Fe^{2+} se oxida. (Miret et al., 2003) El Fe^{3+} que se produce es menos soluble, por lo tanto, para ser absorbido se reduce a hierro ferroso por la reductasa férrica DCytb1 (Schlottmann, 2017). Además de la actividad reductasa endógena de las células, otros componentes de la dieta y factores luminales como el ácido gástrico, el ácido ascórbico, y el citrato mantienen el hierro inorgánico en un estado soluble y reducido (Miret et al., 2003). Posteriormente el hierro entra a los enterocitos por el transportador divalente de metales DMT1 también conocido como: DCT1 /Nramp/Slc11a2, que se expresa en la membrana apical. Este transporte está acoplado al gradiente de protones (Gunshin et al., 1997; Tandy et al., 2000). Además de Fe^{2+} DMT1, se ha demostrado en ensayos in vitro que DMT1 puede transportar Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} (Garrick et al., 2003). El hierro recién absorbido puede ser almacenado en Ferritina o

exportado y distribuido a los tejidos que lo requieran. PCB1 actúa como una chaperona citosólica para facilitar la incorporación de hierro a Ferritina (Shi et al., 2008). Dentro de este heteropolímero el hierro se almacena en forma de hierro férrico hidratado.

Posteriormente el transporte de hierro a través de la membrana basolateral requiere del transportador Ferroportina (Donovan et al., 2000) y Hephaestina; una oxidasa multicobre (Vulpe et al., 1999). Estudios recientes de Chandrika N. et al demostraron en 2018, que el calcio extracelular es cofactor de la ferroportina para mediar el eflujo (Deshpande et al., 2018). El cobre también es requerido para la absorción de hierro dado que es un grupo prostético de Hephaestina (Vashchenko y Macgillivray, 2013) El hierro es oxidado a Fe^{3+} por acción de Hephaestina y es liberado para ser incorporado a Transferrina sérica. Esta proteína posee dos sitios de unión a hierro (Harris et al., 1975). El hierro férrico unido a transferrina es la mayor fuente de hierro para las células en tejidos periféricos, cuando interactúa con el receptor de transferrina se endocita (Ponka y Nam, 1999). En el endosoma, dado el pH ácido el hierro se disocia de transferrina y es exportado por DMT1 al citosol. El complejo transferrina y receptor de transferrina se recicla y regresa al borde celular.

Contrario a los enterocitos localizados en el lumen intestinal del duodeno, las células de la cripta son células inmaduras no diferenciadas, absorben el hierro unido a transferrina en circulación, a medida que las células maduran, migran hacia el lumen intestinal y adquieren características absorbentes (Morgan y Oates, 2002)

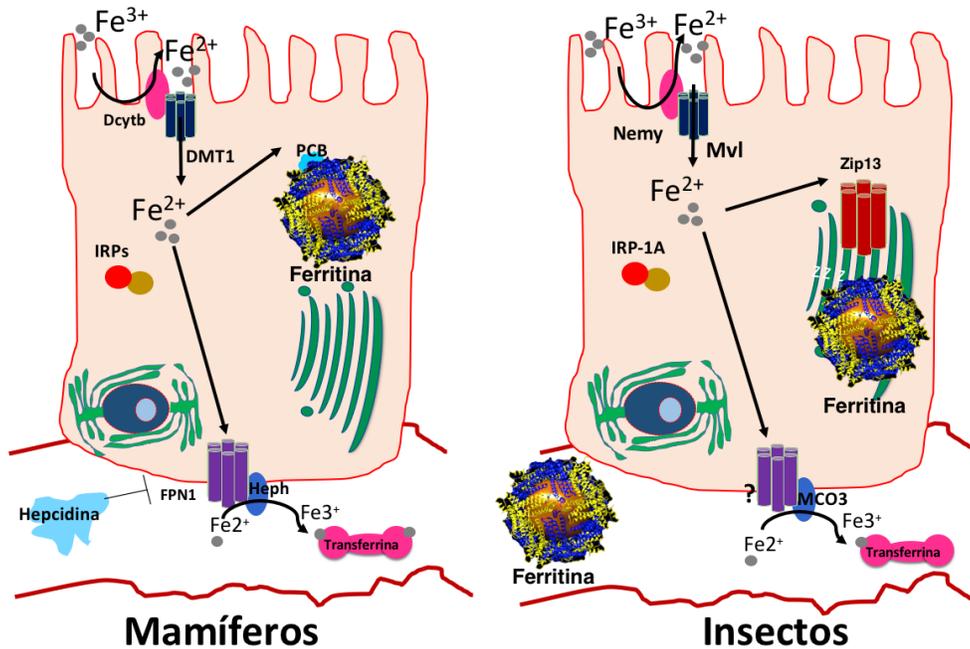


Figura 1. Mecanismo de absorción de hierro. Proceso de absorción en mamíferos (izquierda) y en el insecto *D. Melanogaster* (derecha). Se muestran las proteínas homólogas conocidas. La localización subcelular de la ferritina difiere entre mamíferos y *D. melanogaster*.

1.3 Absorción de Hierro intestinal en insectos.

Al igual que en mamíferos; asegurar la biodisponibilidad de hierro también es indispensable para el desarrollo (González-Morales et al., 2015). La absorción de hierro es un proceso conservado, pero no idéntico. Se han identificado genes con funciones conocidas en el metabolismo de hierro y a otros se les ha asignado una función putativa. El intestino medio de *Drosophila* corresponde al intestino delgado en mamíferos está compuesto por enterocitos absorbentes en su mayoría y células enteroendocrinas. Consta de un epitelio simple rodeado de musculo visceral, nervios y tráquea. Esta subdividido en regiones anatómicas con distintas funciones metabólicas y digestivas (Lemaitre y Miguel-Aliaga, 2013). Es ahí donde se lleva a cabo la absorción de hierro dietético en *Drosophila*.

Malvolio , Mvl es el homólogo de DMTI en *Drosophila*, solo existe una copia de este gen, se expresa en el intestino medio, se localiza en el endosoma y membrana plasmática de los

enterocitos (Southon et al., 2008). Dos genes homólogos a *DCYTB* también han sido reportados, *CG1275* y *no extended memory (nemy)* (Kamyshev et al., 2002). La mutante *nemy* fue identificada como un regulador de la función de peptidil-hidroxilasa monooxigenasa, PHM; una enzima requerida para la amidación de péptidos (Iliadi et al., 2008). Esta enzima es dependiente de cobre, *Dcytb* en mamíferos reduce cobre, es por eso que *nemy* podría estar implicado en la absorción de hierro intestinal, pero a la fecha esto no ha sido elucidado.

Al interior del enterocito el Fe^{2+} recién absorbido puede ser almacenado o exportado a la hemolinfa, líquido circulatorio análogo a la sangre en vertebrados. Al igual que en mamíferos, el hierro se almacena en ferritina un heteropolímero con subunidades H y L codificadas por los genes *Fer1HCH* y *Fer2LCH* respectivamente (Hamburger et al., 2005; Mandilaras et al., 2013). Sin embargo y a diferencia de estos, donde el eflujo de hierro es generalmente mediado por el sistema ferroportina/hepaestina, en moscas no se ha identificado un homólogo a ferroportina (Tang y Zhou, 2013), el único exportador conocido en mamíferos. En contraste el hierro es exportado en su mayoría por ferritina. La ferritina de *D. melanogaster* es secretada (Hamburger et al., 2005; Mandilaras et al., 2013). El transportador de zinc ZIP13 media el eflujo de hierro hacia la vía secretora para que este se incorpore a ferritina, subsecuentemente el hierro transportado por ferritina es liberado a la hemolinfa para uso sistémico pues la pérdida de función de Zip13 o Ferritina en el intestino de *Drosophila* lleva a una deficiencia de hierro sistémico (Xiao et al., 2014)

Si la ferritina en hemolinfa transporta hierro de una célula a otra, podríamos hablar de un receptor de ferritina. Esto tampoco ha sido estudiado y la pregunta permanece abierta.

Las oxidasas multicobre son proteínas ubicuas que realizan una gran variedad de funciones además de participar en la homeostasis del hierro están involucradas en pigmentación, síntesis y degradación de lignina, morfogénesis. Poseen múltiples centros cobre donde diferentes sustratos son oxidados.

El genoma de *Drosophila* codifica para cuatro genes MCO homólogos a Hephaestina/ceruloplasmina (Dittmer y Kanost, 2010). MCO2 es un lacasa, MCO4 no se a estudiado, MCO1 pensada originalmente como una ferroxidasa ahora se sabe que oxida ascorbato. A la fecha la única ferroxidasa putativa que se cree participa en la absorción de hierro intestinal es MCO3 (Wang et al., 2018). El genoma de *D. melanogaster* codifica para tres homólogos de transferrina: Tsf1, Tsf2 y Tsf3 (Tiklová et al., 2010; Yoshiga et al., 1999). Tsf1 es abundante en la hemolinfa (B. Dunkov y Georgieva, 2006). En un artículo reciente Guiran Xiao *et al* en 2019 determinaron que Tsf1 participa en el tráfico de hierro. El knockdown de Tsf1 conlleva a la acumulación de hierro en el intestino de *D. melanogaster* con deficiencias en el cuerpo graso (órgano análogo al hígado en vertebrados). Mas aun Tsf1 derivada del cuerpo graso migra hacia la superficie del intestino (Xiao et al., 2019). Aun con este descubrimiento importante en el metabolismo de hierro, la pregunta si existe un gen homologo al receptor de transferrina aguarda investigación. Hasta ahora no se ha encontrado ningún homólogo en las bases de datos de genomas de insectos (Mandilaras et al., 2013; Tang y Zhou, 2013). Dada la abundancia de la Tsf1 en la hemolinfa pensar en un sistema de captura suena lógico. Si es el caso dos cosas pueden estar ocurriendo: el gen a divergido mucho en la secuencia que no puede ser reconocido o existe un sistema de captura para Tsf1 que no ha sido elucidado (Mandilaras et al., 2013)

1.4 Ferritina: Estructura, Función y Regulación

Las ferritinas son proteínas ubicuas altamente conservadas que almacenan hierro en su cavidad, juegan un papel importante en la homeostasis celular del hierro pues este metal puede generar especies reactivas del oxígeno o a través de la reacción de Fenton, que donan macromoléculas. Las ferritinas regulan los niveles de hierro intracelular al secuestrarlo y almacenarlo en su interior. (Arosio, et al., 2017; Torti, 2002)

La familia de las ferritinas consiste en tres subfamilias, la primera son las ferritinas típicas compuestas por 24 subunidades con centro de hierro binuclear, la segunda familia, comprende las bacterioferritinas, las cuales además del sitio hierro binuclear y estar

compuestas por 24 subunidades poseen el grupo hemo covalentemente unido, finalmente la tercera familia son las proteínas DPS que se unen al DNA, poseen solo 12 subunidades y son generadas durante la fase estacionaria. Los procariontes poseen las tres subfamilias mientras que los eucariontes únicamente la primera (Bai et al., 2015).

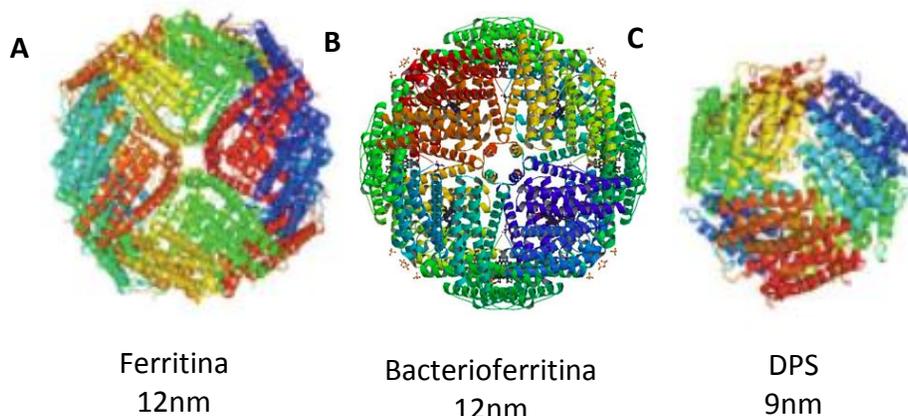


Figura 2. Familia de las ferritinas. (A) Estructura de la Ferritina (PDB ID: 1DAT). (B) Estructura de la bacterioferritina (PDB ID: 2Y3Q). (C) Estructura de la proteína DPS (DNA binding protein from starved cells) (PDB ID: 1QGH).

Estructuralmente las ferritinas son un complejo multimerico con 24 subunidades que se ensamblan para formar una esfera de simetría octaédrica con un diámetro de 8-12 nm que contiene una cavidad central en la cual se forma un núcleo de hierro mineralizado conocido como ferrihidridta ($\text{Fe}^{3+}_4\text{-5(OH,O)}_{12}$) que puede almacenar hasta 4500 átomos de hierro. (Arosio, et al., 2017)(Jin et al.,2019)El autoensamblaje de las subunidades es un pre-requisito para la oxidación del Fe^{2+} al crear una vía de entrada que dirige los átomos de hierro hacia el centro catalítico. (Hagen et al., 2017) (Bradley et al., 2017) Las ferritinas están compuestas por dos tipos de subunidades: H o “heavy” (22.8 kDa) y L o “light” (20kDa). Son codificadas por los genes *FTH1*(Ch.11) y *FTL*(Ch. 19) respectivamente. (Torti, 2002)

Ambas subunidades poseen una estructura secundaria 5- α -hélice. Las hélices A-D constituyen el núcleo estructural mientras que la hélice E sale del motivo estructural en un ángulo de 60° . Las hélices A-B forman un bucle corto mientras que las hélices B-C forman

un bucle largo. A y C junto con la región N- terminal y el bucle B-C están expuestas afuera de la superficie mientras que las hélices B y D están orientadas al interior. Interacciones hélice-hélice intra e inter subunidad favorecen la estabilidad de la proteína al mismo tiempo que mantienen suficiente flexibilidad para permitir el tráfico de hierro dentro y fuera de la cavidad. (Finazzi y Arosio, 2014)

Las subunidades son genéticamente y funcionalmente distintas, la subunidad H contiene residuos aminoácidos conservados que conforman el centro de ferroxidasa, esto es la región espacial donde se lleva a cabo la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , mientras que la subunidad L posee grupos ácidos expuestos hacia el interior de la cavidad que facilitan la mineralización. (Arosio et al., 2017; Bai et al., 2015; Torti, 2002)

La transferencia de hierro dentro de la cavidad ha sido estudiada in vitro. De forma general mecanísticamente dos átomos de Fe^{2+} se unen a ferritina en las cadenas laterales a través de grupos carboxilato, estos grupos se alinean en las intersecciones denotadas como 3-fold channels y los átomos de Fe^{2+} se desplazan hacia el centro de ferroxidasa en la subunidad H, es aquí donde ocurre la oxidación del Fe^{2+} en presencia de O_2 y como producto se genera peróxido de hidrogeno que después se consume en otra reacción de oxido-reducción en un centro de ferroxidasa adyacente. Los átomos de Fe oxidados se mueven a la cavidad, se hidrolizan y comienzan a formar el núcleo mineral. El almacenamiento de hierro es un proceso reversible pues está disponible si la demanda celular lo requiere. El mecanismo que describe la salida de hierro en ferritina, aunque no del todo dilucidado sugiere que los canales 3-fold también participan. In vitro la salida de hierro ocurre en presencia de agentes reductores y quelantes. El aumento de la temperatura, incremento en la concentración de agentes caotropicos o mutagénesis dirigida en residuos clave también disminuye la estabilidad de este conducto que media la salida de hierro, de cualquier manera, para que los átomos de hierro sean movilizados estos deben ser reducidos a una forma soluble Fe^{2+} (Finazzi y Arosio, 2014)

Hasta ahora la maquinaria celular responsable de la reducción de hierro que está presente en la cavidad de ferritina no ha sido identificada, se desconoce también si el proceso es regulado. Si el mecanismo no fuera controlado esto significaría que la oxidación de ferritina producto de una alteración fisiológica (e.g. que se libere el hierro) podría repercutir en la eliminación de la apoferritina, pues en mamíferos las proteínas oxidadas se degradan por el proteosoma. (De Domenico et al., 2006; Raynes, et al., 2016) demostró la oxidación de ferritina in vitro por la subunidad proteosomal 20S. Por otro lado, estudios con células de mamíferos han demostrado que el hierro se libera por degradación de ferritina específicamente en los lisosomas cuando son tratados con diferentes quelantes de hierro. (Asano et al., 2011) Esto permitiría proteger los organelos celulares del potencial daño. Otros reportes a nivel proteómico identificaron a NCOA4 (receptor nuclear co-activador 4) como una proteína cargo que media el transporte de ferritina al autofagosoma. En conjunto las diferentes vías de degradación son reclutadas para liberar el hierro de ferritina, posiblemente dependiendo del tipo de célula y/o las condiciones fisiológicas. (Goralska et al., 2005)

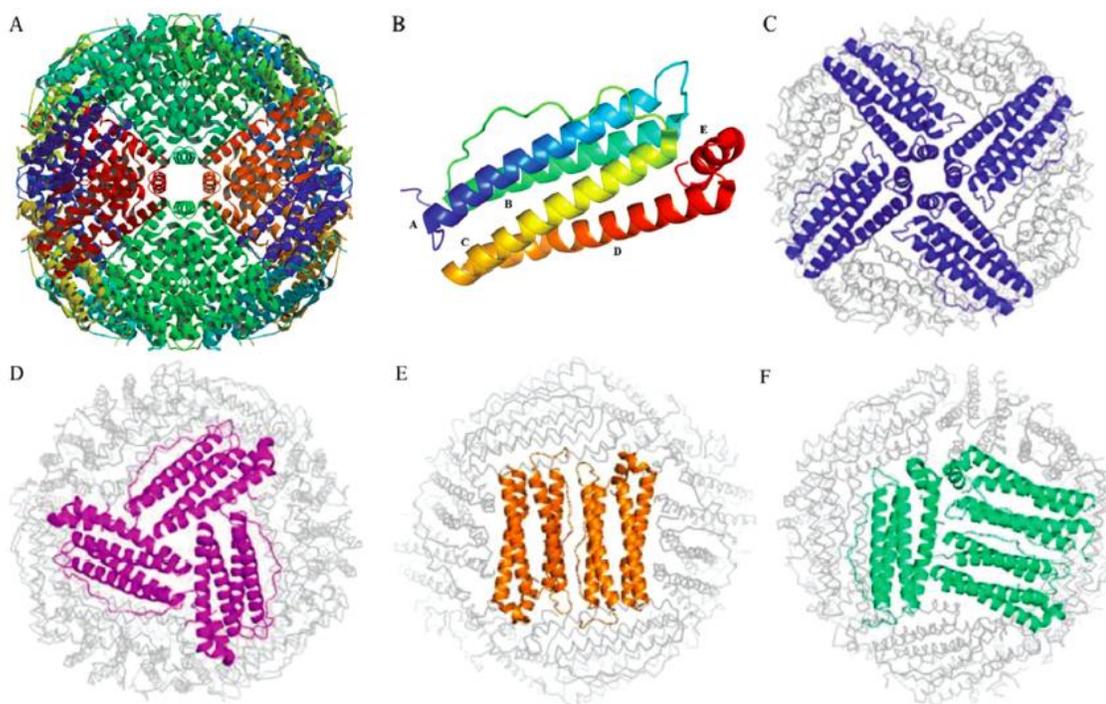


Figura 3. (A) Estructura de la ferritina humana 24 mer PDB ID: 2FHA. (B) Estructura del monomero H, las 5 helices (A-E) denotadas como corresponde. (C) (D) (E) (F) Representan los cuatro tipos de interfaces: 4-fold channels, 3-fold channels, 2-fold channels y 3-4 fold channels que se forman durante el auto ensamblaje de la proteína.

En mamíferos las ferritinas tienen localización mitocondrial, nuclear y citoplasmática. La ferritina mitocondrial es codificada por el gen nuclear *FTMT*, genes homólogos han sido identificados en plantas, insectos y algunos mamíferos. Posee expresión tejido específico preferencialmente en testículos, particularmente en células con alto consumo de oxígeno y actividad metabólica. Estructuralmente es análoga a la subunidad H de la ferritina humana. (carpetas mitocondria (Guaraldo et al., 2016; Missirlis et al., 2006) La ferritina nuclear es producto del mismo gen que codifica para la ferritina H-citosólica, (Surguladze et al., 2005) no posee secuencia de localización nuclear característica, la translocación nuclear parece estar mediada por una chaperona; ferritoid, aunque esta proteína tiene expresión limitada a células endoteliales de la córnea (Millholland et al., 2003) o bien por modificaciones post-

traduccionales como la O-glicosilacion. Funcionalmente la presencia de la ferritina en el núcleo plantea la posibilidad de: conferir protección al DNA del estrés oxidante, unión al DNA y mediar la regulación transcripcional de ciertos genes (Surguladze et al., 2005). La ferritina citosólica por otro lado se ensambla con las dos subunidades: H y L, existe un control transcripcional de los genes de ferritina que influencia la proporción de cadenas H a L en los diferentes tipos celulares (Arosio et al., 2017; Bai et al., 2015; Finazzi y Arosio, 2014; Torti y Torti, 2002). Por ejemplo, en tejidos como el hígado o el bazo donde el hierro es principalmente almacenado predominan subunidades L (Harrison, 1986), en el corazón o los riñones donde el hierro mayoritariamente se oxida abundan complejos con subunidades H. Pequeñas cantidades de ferritina están presentes también en suero, esta ferritina almacena poco hierro, está compuesta mayoritariamente por subunidades L y es parcialmente glicosilada (Wang et al., 2010). Muchos aspectos de la ferritina en suero incluido el origen y mecanismo de secreción, se desconocen. Trabajos recientes apuntan que se secreta principalmente por macrófagos a través de una vía secretora no convencional que involucra autofagosomas secretores (Cohen et al., 2010). Es usada como marcador clínico de la cantidad de hierro en el cuerpo, se eleva en condiciones como exceso de hierro e inflamación (Wang et al., 2010). Otras funciones para la ferritina han sido sugeridas, incluyendo rol en inmunidad y autoinmunidad, metabolismo lipídico, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o en enfermedades como Parkinson o Alzheimer se han reportado incrementos en la expresión de los niveles de ferritina y la concentración de hierro férrico (Drakesmith et al., 2005; Jellinger et al., 1990; Rockfield et al., 2018)

La inactivación de la subunidad H es letal para el desarrollo embrionario, mientras que la inactivación condicional en ratones adultos no lo es. Aun así la pérdida de esta subunidad genera mayor sensibilidad al exceso de hierro y al daño oxidante. Para la subunidad L sin embargo cinco enfermedades han sido identificadas resultado de mutaciones en este gen. Estas patologías incluyen: hiperferritinemia hereditaria con síndrome de catarata, neuroferritinopatía, hiperferritinemia benigna, deficiencia autosómica dominante de L-ferritina y deficiencia autosómica recesiva de L-ferritina. Cabe señalar que la deficiencia en

la subunidad L no afecta la homeostasis del hierro o incrementa el daño oxidante. (Kato et al., 2001)

Ferritina no solo secuestra el hierro en su cavidad, los niveles de hierro lábil también regulan la ferritina intracelular. Esta regulación de ferritina dependiente de hierro es un mecanismo post-transcripcional mediado por el sistema IRP/IRE (Anderson et al., 2012). Cuando los niveles de hierro son bajos la síntesis de ferritina cesa inversamente cuando los niveles de hierro son altos hay un incremento en la síntesis de las subunidades. Esto ocurre a través de la interacción entre una proteína de unión a RNA conocida como IRP (Iron-responsive element-binding protein) y la porción 5' no traducida de los transcritos de las subunidades H y L en una región denominada IRE (Elemento de respuesta a hierro) que tiene una estructura secundaria tallo bucle. Una estructura IRE canónica está compuesta por un bucle apical de 6 nt (5'-CAGWGH-3') donde W puede representar una A (adenina) o U (uracilo) y H representa A, U o C (citocina) en un tallo de 5 nucleótidos apareados, además de una C no apareada que genera un pequeño bucle asimétrico y pares de bases adicionales en la parte baja del tallo de longitud variable (Campillos et al., 2010)

Existen dos proteínas IRP, IRP1 e IRP2 que se unen a esta estructura secundaria, aunque son regulados de manera distinta. IRP1 es una proteína de identidad dual, cuando el hierro es abundante está en forma de aconitasa citosólica con un cluster [Fe-S] cubano mediando la conversión de citrato a isocitrato y los transcritos de ferritina son traducidos eficientemente. Sin embargo, cuando el hierro es escaso el clúster se desensambla de la aconitasa (e.g) adquiere una conformación abierta y puede unirse al IRE para inhibir la traducción de las subunidades H y L. En contraste IRP2 es regulado por degradación; cuando los niveles de hierro son escasos IRP2 está en forma abundante y unida al IRE, pero es degradada rápidamente cuando el hierro está en exceso. Aunque ambas proteínas se unen al IRE existe evidencia que pueden tener funciones tejido-específico (Anderson et al., 2012).

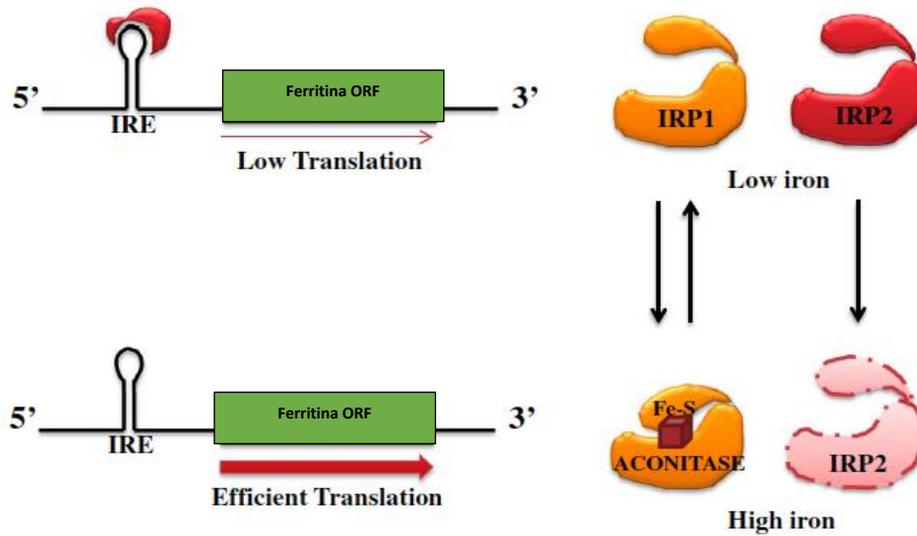


Figura 4. Regulación post-transcripcional de ferritina por el sistema IRP/IRE. En bajas concentraciones de hierro las proteínas IRP1 e IRP2 están unidas a la secuencia IRE de los transcritos H y L inhibiendo la traducción de las subunidades. En altas concentraciones de hierro, IRP1 está en forma de aconitasa citosólica mientras que IRP2 es degradada, y los transcritos son traducidos eficientemente.

1.5 Ferritina en insectos

Las ferritinas en insectos son proteínas secretadas en su mayoría, al igual que en mamíferos están compuestas por dos subunidades. La subunidad H codificada por el gen homólogo *Fer1HCH* (Ferritin 1 heavy chain homologue) y la subunidad L por el gen homólogo *Fer2LCH* (Ferritin 2 light chain homologue). (Pham y Winzerling, 2010) A diferencia de los vertebrados los genes que codifican para ferritina en *Drosophila melanogaster* se encuentran en el mismo cromosoma, en una organización "head to head" compartiendo regiones regulatorias (Aprox 400 pares de bases que se superponen). (dunkov et al) (deron et al) Esta organización es conservada en otras especies de *Drosophila*, mariposas y mosquitos. Esto favorece la regulación coordinada de genes relacionados y co expresados (Figura 5) (Chen et al., 2014).

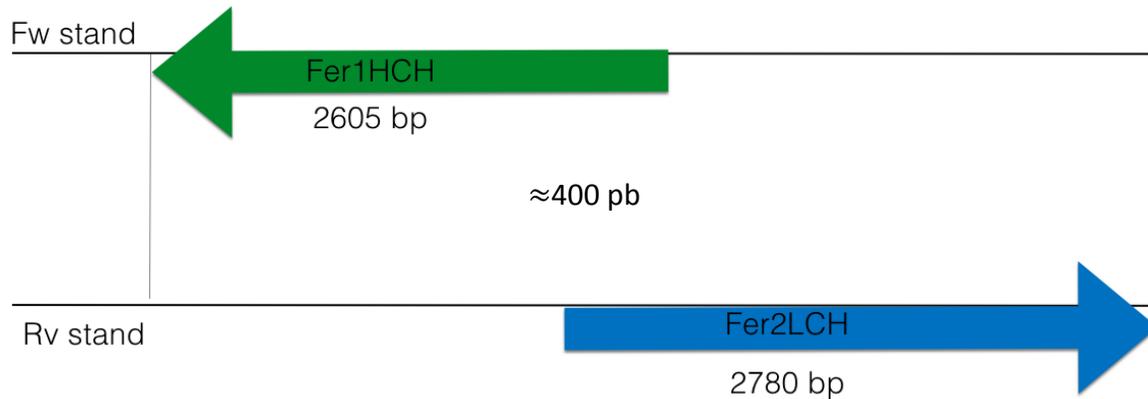


Figura 5. Organización genética de los genes de ferritina en *D. melanogaster*. 3er Cromosoma. Los genes que codifican para ambas subunidades; *Fer1HCH* y *Fer2LCH* están en una orientación "head to head". Comparten regiones regulatorias apróx 400 pb. El factor de transcripción no ha sido identificado aún.

Las subunidades son glicosiladas y se localizan en el reticulo endoplasmico y hemolinfa. Son sintetizadas con un péptido señal que las dirige a la vía secretora. Además de almacenar hierro en su cavidad las ferritinas en *Drosophila* juegan un papel muy importante en el transporte de hierro y respuesta inmune en defensa a patógenos. (Pham y Winzerling, 2010; Zhang et al., 2006)

Hasta la fecha la única estructura cristalografica de una ferritina secretada se obtuvo en 2005 por Hamburguer et al. a partir de *Trichoplusia ni* (oruga de la col) con una resolución de 3.1 Å (Figura 6). El complejo multimerico está formado por 12 subunidades H y 12 subunidades L organizadas con una simetría tetraédrica en contraste con las ferritinas de mamíferos que poseen estructura octaédrica y diferente proporción de subunidades. (Hamburger et al., 2005)

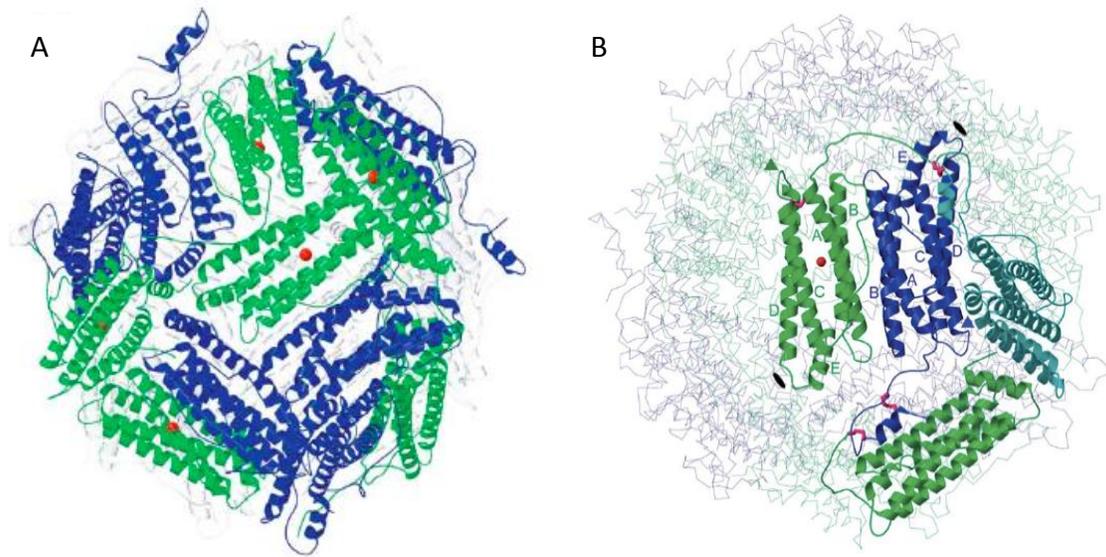


Figura 6. Estructura de *T. ni*, una ferritina secretada con arreglo simétrico de 12 subunidades H y 12 subunidades L. (A) Diagrama de listón que muestra las subunidades H en verde con los iones Fe³⁺ en los centros de ferroxidasa en rojo. En azul las subunidades L. (B) Puentes disulfuro formados intra e inter subunidad están mostrados en color magenta. La región N-terminal de cada subunidad se extiende hacia afuera del núcleo estructural y forma un puente disulfuro con una subunidad no adyacente de tipo opuesto. Las hélices A-E están denotadas en verde para la subunidad H y en azul para la subunidad L..

La simetría tetraédrica de la estructura está formada por dos tipos distintivos de 3-fold channels. Los canales formados exclusivamente con subunidades L poseen iones coordinados que forman el sitio de nucleación del metal. Los poros creados por canales formados por subunidades H, están relativamente abiertos y proveen un camino que dirige los átomos de Fe²⁺ hacia el sitio catalítico o centro de ferroxidasa. (Hamburger, et al., 2005)

La estructura secundaria en *T. ni*, también es parecida a la estructura secundaria de otras ferritinas en vertebrados. El núcleo estructural posee 5- α -hélices: A-E. Una notable diferencia es la extensión de 10 a 20 pares de bases en la región N-terminal en ambas subunidades. Estas extensiones únicas de ferritinas secretadas forman bucles extendidos que forman puentes entre subunidades adyacentes. (Hamburger, et al., 2005)

Como en vertebrados el sistema IRP/IRE está presente en la mosca (Rotherberg et al). El genoma de *Drosophila* no codifica para el gen IRP2, pero existen dos genes IRP1: IRP1A e IRP1B, solo IRP1A tiene una función dual como en vertebrados, IRP1B se cree que sólo actúa como aconitasa. (Lind et al., 2006) Una estructura IRE funcional está presente en la región 5' del transcrito de Fer1HCH (Dunkov y Georgieva, 1999) En contraste los transcritos de Fer2LCH no tienen una secuencia IRE presente, pero se ha observado co-regulación de las mismas (Georgieva et al., 2002). Muy recientemente Huynh et al., 2019 hizo un descubrimiento fundamental al demostrar que IRP1 en su forma apo se transloca al núcleo donde parece regular a la baja genes implicados en el metabolismo de hierro (Huynh et al., 2019).

2. ANTECEDENTES

Uno de los primeros acercamientos para estudiar el ensamblaje de ferritina *ex vivo* surgió en 2007 con Missirlis *et al* 2007 con la cepa Fer1HCH^{G188/+}. Esta línea se generó mediante un exón móvil que codificaba para la proteína verde fluorescente y era transportado por un elemento P insertado en la secuencia endógena del gen *Fer1HCH* (Morin et al., 2001) después de un extenso screening se eligió esta cepa pues la inserción de la proteína GFP no modificaba la localización endógena de la subunidad H (Figura 7).

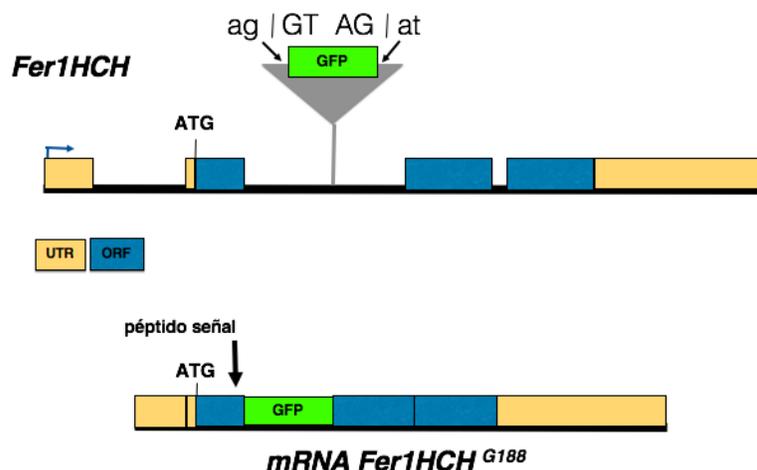


Figura 7. Organización genómica de la cepa *Fer1HCH^{G188/+}*. La inserción genómica del elemento P que contenía la proteína GFP se muestra en un triángulo gris. Los recuadros amarillos representan las regiones UTR y los recuadros azules los ORF. Después de que el péptido señal se remueve, la GFP se queda en la parte N-terminal de Fer1HCH.

Moscas silvestres y moscas heterocigotas *Fer1HCH^{G188/+}* fueron cargados en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y las subunidades Fer1HCH y Fer2LCH detectadas con anticuerpos peptídicos anti-Fer1HCH y anti-Fer2LCH (Figura 8). Para las moscas con genotipo *Fer1HCH^{G188/+}* los resultados indicaron dos bandas, una con un peso molecular aproximado de 23 kDA y la otra en 50 kDA consistente con la suma de la etiqueta de GFP de 27kDA. Las subunidades Fer2LCH no cambiaron comparadas con el control silvestre. Posteriormente se determinó si estos monómeros etiquetados formaban parte del complejo multimerico. Los mismos extractos anteriormente usados se cargaron en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras. En moscas silvestres una sola especie de ferritina migró cercana a la ferritina de hígado de ratón usada como control. En los extractos de moscas *Fer1HCH^{G188/+}* varias bandas de mayor peso molecular fueron detectadas, con esto se validó que se formaban polímeros de ferritina en estas moscas y que las diferentes bandas reflejan distintas proporciones de subunidades Fer1HCH Y GFP-Fer1HCH incorporadas el complejo. No se detectaron complejos endógenos formados únicamente por subunidades Fer1HCH y Fer2LCH en la línea *Fer1HCH^{G188/+}* confirmando que los polipéptidos fusionados generan complejos funcionales. Finalmente se preguntaron si los polímeros que incorporaban las subunidades GFP-Ferritina almacenaban hierro. Las moscas se alimentaron con hierro radioactivo ⁵⁵Fe y se reveló una placa de un gel corrido en paralelo que demostró la incorporación de ⁵⁵Fe en los complejos de ferritina etiquetados con GFP.

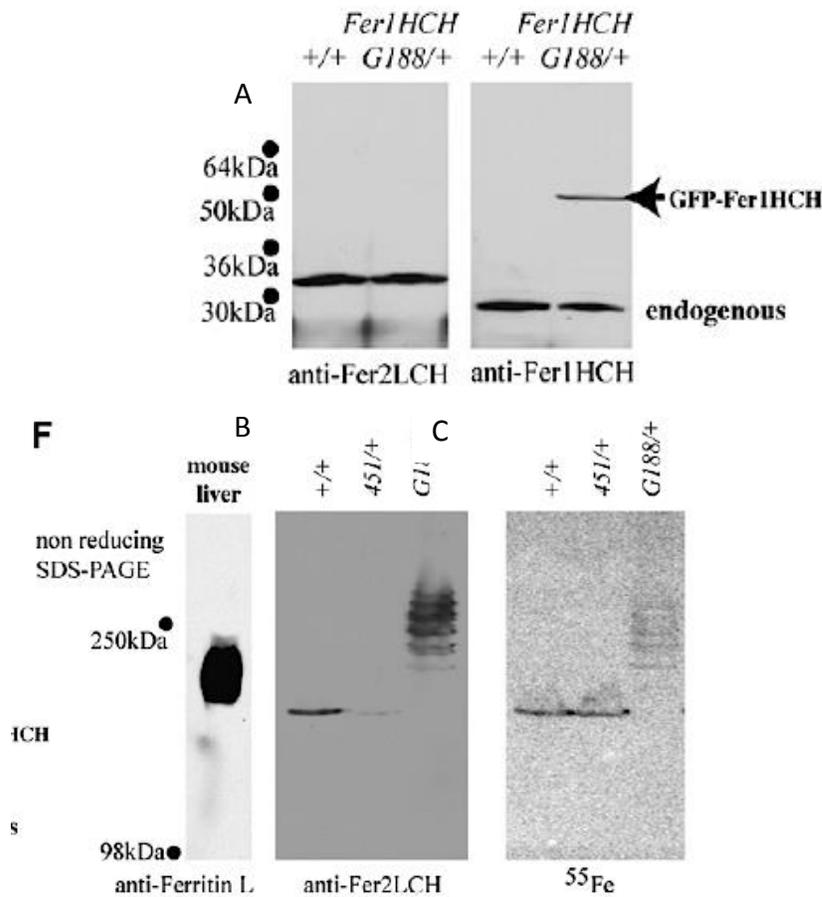


Figura 8. Caracterización de la cepa *Fer1HCH*^{G188/+}. (A) Extractos proteicos de moscas silvestres (+/+) y moscas *Fer1HCH*^{G188/+} fueron cargados en geles en condiciones reductoras. Western blots revelados con anti-Fer1HCH y anti-Fer2LCH. (B) Extractos proteicos provenientes de hígado de ratón, moscas silvestres y moscas *Fer1HCH*^{G188/+} cargados en geles en condiciones no reductoras. (C) Auto radiografías de los geles corridos en paralelo. 24 horas antes las moscas se alimentaron con ⁵⁵FeCl₃-NTA. Las mismas especies de mayor peso molecular se observan en el genotipo *Fer1HCH*^{G188/+} confirmando que los polímeros funcionales incorporan GFP-Ferritina.

La expresión de ferritina es abundante en la parte media del intestino de *Drosophila* y en otras especies de insectos, esta expresión es inducida por la presencia de hierro dietético. por lo que se evaluó también si el patrón de expresión de GFP-Fer1HCH era similar a las proteínas no etiquetadas. En la Figura 9, se observa que GFP ferritina es prominente en la parte media del intestino conocida como región de hierro y que al añadir hierro en la dieta

(5mM de citrato férrico de amonio) hay inducción de ferritina en la región anterior además de conservar la expresión constitutiva en la parte media.

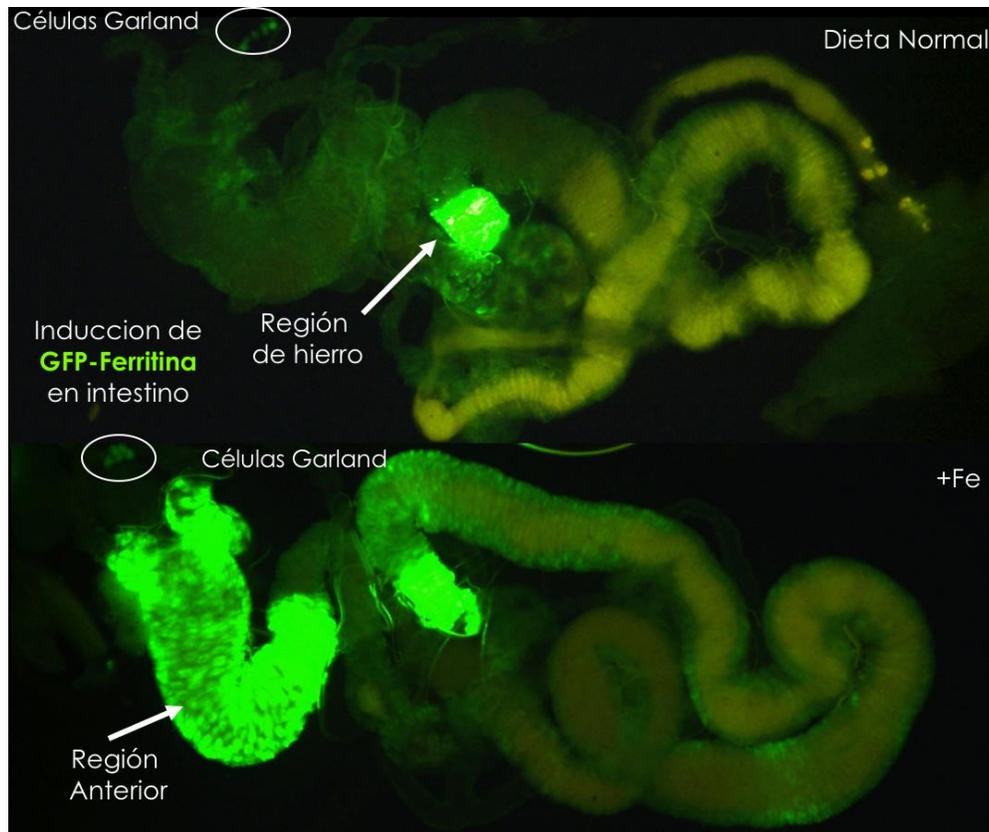


Figura 9. Expresión de GFP-Ferritina en el intestino de larvas de *D. melanogaster*. GFP-Ferritina se expresa fuertemente en la región de hierro en condiciones normales. (Abajo) GFP-Ferritina se induce en la parte anterior del intestino y prevalece en la región de hierro cuando se añade hierro a la dieta. La herramienta genética diseñada recapitula la expresión de las subunidades endógenas previamente reportada. Imagen no publicada.

Finalmente, Missirlis y colaboradores se enfocaron en la región anterior para evaluar la temporalidad en la inducción de ferritina a nivel subcelular (Figura 10)

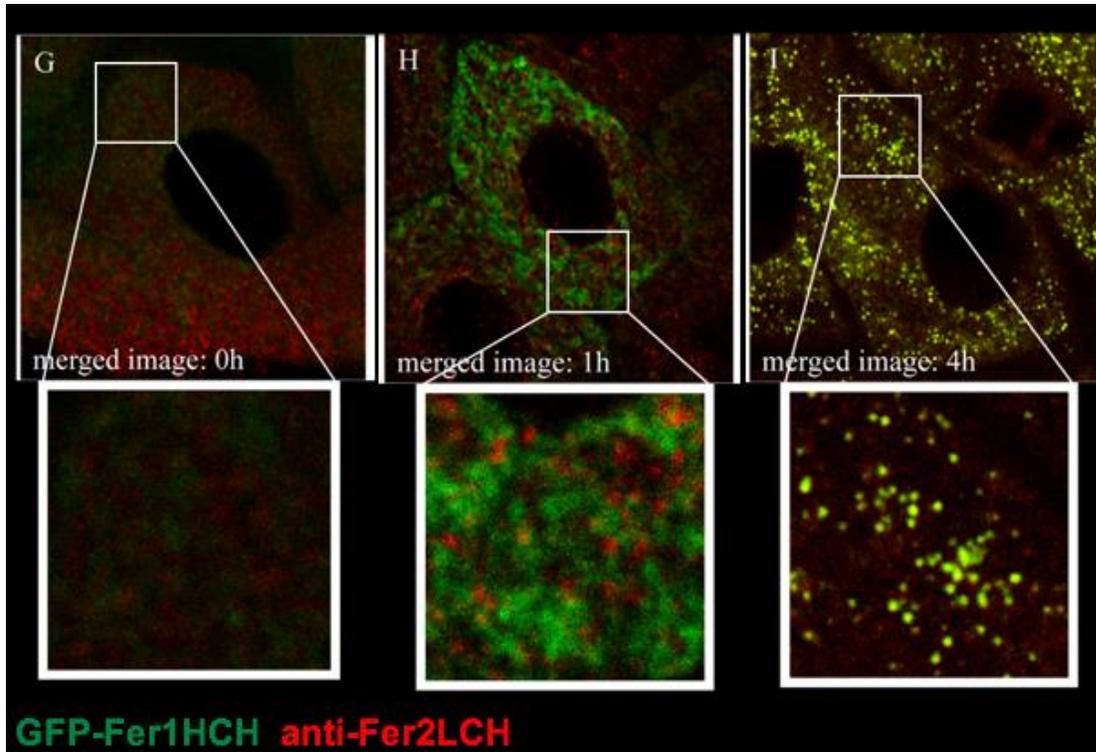


Figura 10. Curso temporal de la inducción de ferritina en la región anterior en verde GFP-Fer1HCH, en rojo Fer2LCH. (G) Una hora antes del pulso de hierro las subunidades tienen baja expresión. (H) Una hora después del pulso de hierro hay fuerte inducción de ambas subunidades, aunque en diferentes compartimentos subcelulares. GFP-Ferritina se localiza en el retículo endoplásmico mientras que Fer2LCH en vesículas del Golgi. (I) Cuatro horas posteriores al pulso de hierro es posible visualizar la colocalización de ambas subunidades en el Golgi.

En los enterocitos de la región anterior ambas cadenas fueron teñidas antes de añadir hierro dietético, las subunidades se expresan en bajos niveles (Figura 10 G), una hora después del pulso de hierro GFP-Ferritina es detectada en lo que parece ser el retículo endoplásmico, pero las subunidades L están presentes en el Golgi sin la presencia de GFP-Ferritina (Figura 10 H). En contraste cuatro horas posteriores al pulso de hierro ambas subunidades son fuertemente inducidas y solo están presentes formando un complejo pues se observa total colocalización (Figura 10 I).

Con estas observaciones se concluyó que las subunidades de ferritina son: modificadas en compartimentos vesiculares distintos antes de ensamblarse para formar un complejo, al compartir regiones regulatorias puede existir co-regulación post-transcripcional que module el proceso de ensamblaje y controle la proporción de las cadenas para asegurar las mismas cantidades y que existan modificaciones post-traduccionales que antecedan la formación del complejo.

Para probar esta hipótesis, Rosas-Arellano *et al* en 2016 diseñaron la construcción *UAS-mCherry-Fer2LCH*. La proteína fluorescente mCherry se insertó en la región N-terminal justo después del sitio de corte predicho de la secuencia del péptido señal. Se diseñó una construcción con base en el sistema Gal4 para inducir a *UAS-mCherry-Fer2LCH* río abajo del *UAS* de forma dependiente de hierro con el driver *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4* (Figura 11). Primero se evaluó si este recapitulaba la expresión endógena de las subunidades en el intestino de larvas, específicamente en la región anterior. Estas moscas se cruzaron con moscas *Fer1HCH^{G188/+}*, *UAS-stinger-RFP*. En la progenie fue posible monitorizar ambas subunidades, la marca verde fluorescente proveniente de la GFP-Ferritina endógena y la marca roja fluorescente nuclear proveniente del transgén *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4/UAS-mCherry-Fer2LCH*. En condiciones limitantes de hierro (200 uM BPS) *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4* se expresa en la región de hierro y en la región posterior. Cuando se añade 1mM de citrato ferrico de amonio (FAC) a la dieta hay inducción de *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4* en la región anterior, y las mismas células expresan también GFP-Ferritina del promotor endógeno, además la expresión en la región de hierro y la región posterior prevalece.

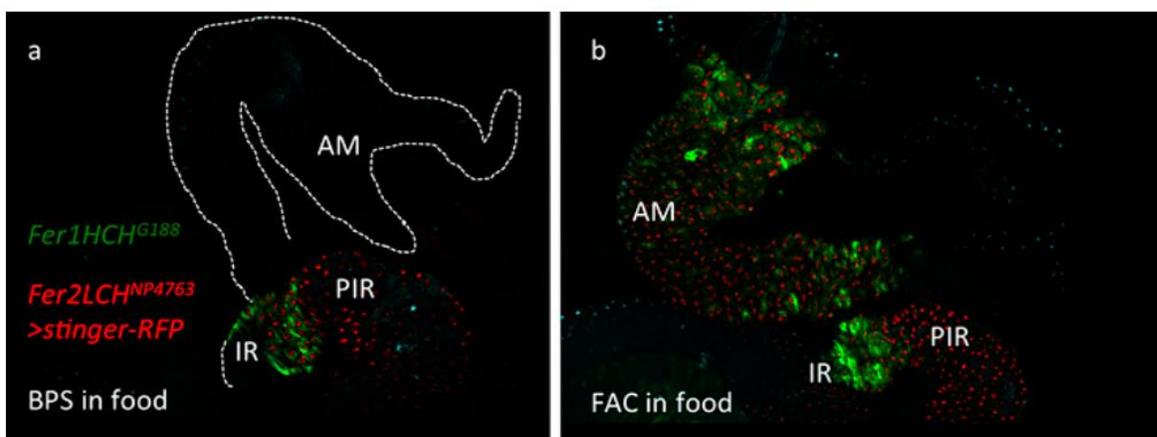


Figura 11. Patrón de expresión del driver *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4* en el intestino de larvas de tercer estadio. (a) Larvas del genotipo: *Fer1HCH^{G188}/Fer2LCH^{NP4763}-Gal4*, *UAS-stinger-RFP* fueron crecidas en una dieta con 200μM de BPS (sulfato de batofenantrolina que es un quelante específico de hierro). La abreviación AM corresponde a la región anterior; IR, región de hierro y PIR, región posterior. Todas las células de la región de hierro denotadas por la marca verde fluorescente proveniente de moscas *Fer1HCH^{G188/+}* también expresan la marca roja fluorescente nuclear (*stinger-RFP*) derivada de la traducción del factor de transcripción Gal4 por activación del promotor endógeno. Esta proteína también se expresa en la región posterior. (b) Larvas del mismo genotipo: *Fer1HCH^{G188}/Fer2LCH^{NP4763}-Gal4*, *UAS-stinger-RFP* fueron crecidas en una dieta suplementada con 1 mM de FAC. En la región anterior se observan ambas marcas fluorescentes, en esta región existe inducción de ferritina en respuesta al hierro por lo que el driver *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4* recapitula la expresión de las subunidades endógenas.

Después de validar el driver, este se cruzó para obtener las moscas *Fer1HCH^{G188}/Fer2LCH^{NP4763}-Gal4*, *UAS-mCherry-Fer2LCH*. Se disectaron intestinos de larvas en tercer estadio, y se realizaron imágenes por microscopía confocal a una magnificación 63x para determinar la localización subcelular de las subunidades de ferritina en los enterocitos. En la Figura 12 a se muestra una célula representativa de la región de hierro con pocas vesículas visibles confinadas a la zona perinuclear, estas vesículas contienen ambas subunidades etiquetadas, hacia la periferia se observa también la inducción de las

dos subunidades, aunque en compartimentos distintos. En la Figura 12 b se muestra un enterocito de la región anterior, las subunidades no colocalizan a pesar de la inducción de ferritina en respuesta al hierro. Estos resultados sugieren que los monómeros mCherry-Fer2LCH no estaban siendo incorporados en la mayoría de los complejos de ferritina.

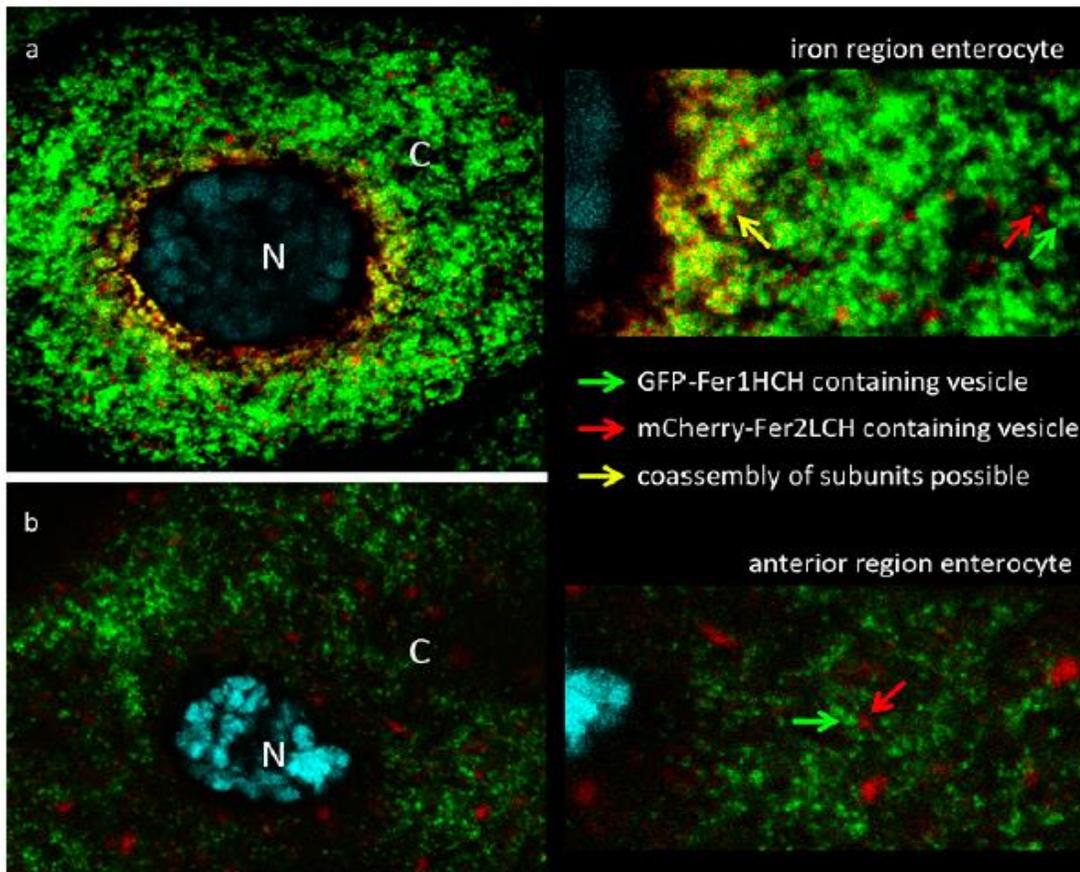


Figura 12. Enterocito de la región de hierro (a) y la región anterior (b) a una magnificación 63x . Imagen obtenida por microscopía confocal. N denota el núcleo marcado con DAPI y C denota el citoplasma. En verde GFP-Fer1HCH, en rojo mCherry- Fer2LCH. Larvas del genotipo: *Fer1HCH^{G188}/Fer2LCH^{NP4763}-Gal4, UAS-mCherry-Fer2LCH* fueron crecidas en una dieta suplementada con 1 mM de FAC. (a) Compartimientos con ambas subunidades se observan en la región perinuclear exclusivamente, hacia la periferia las subunidades aparecen en distintos compartimientos. (b) No hay colocalización de las subunidades.

Para observar los complejos de ferritina cargados con hierro, extractos proteicos de moscas que expresaban GFP-Fer1HCH o mCherry-Fer2LCH fueron cargados en geles en condiciones no reductoras, estos se tiñeron con Azul de Coomasie para revelar las proteínas y con Azul de Prusia para revelar la presencia de hierro férrico (Figura 13). La dos primeras líneas en (a) representan: el control silvestre con una sola banda muy prominente, y la proteína fusión GFP-Ferritina de las moscas *Fer1HCH^{G188/+}* donde se evidencian especies de mayor peso molecular que hacen referencia a subunidades H etiquetadas con GFP formando parte del complejo. El hierro férrico se acumula en estos dos tipos de complejos. En el tercer carril se probó la línea *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4, UAS-mCherry-Fer2LCH*, aparecen especies moleculares de mayor peso aunque en menor abundancia en comparación con el genotipo *Fer1HCH^{G188}* indicando que complejos de ferritina ensamblados estaban presentes, sin embargo, las especies mas abundantes en esta línea y en el carril cinco *Fer2LCH^{NP2602}-Gal4* (otro driver), *UAS-mCherry-Fer2LCH* eran las ferritinas con subunidades endógenas. Mas aún en estas dos líneas solo los complejos silvestres almacenaban hierro en su cavidad. (b) Estos resultados junto con las imágenes de confocal indicaban que el problema residía en la formación del complejo y que la ferritina funcional en estas moscas no tenía subunidades mCherry-Fer2LCH incorporadas.

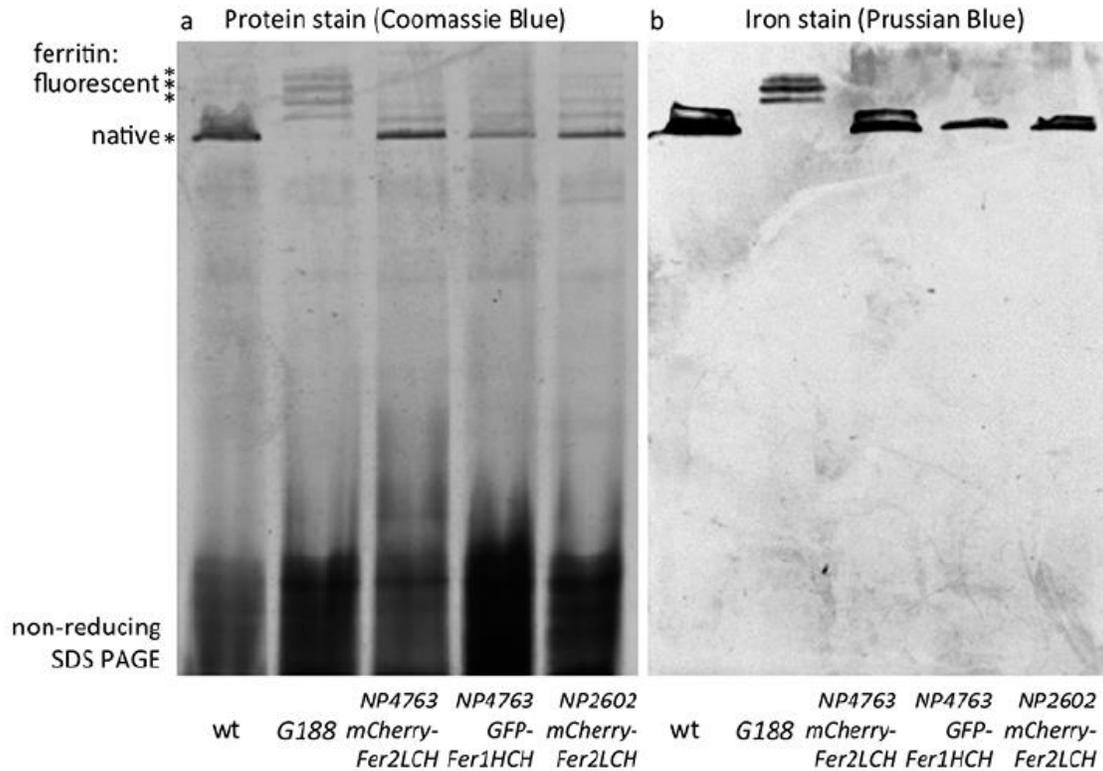


Figura 13. Extractos proteicos de moscas obtenidos a partir de los siguientes genotipos: *wild type*; *Fer1HCH^{G188/+}*; *Fer2LCH^{NP4763-Gal4}*, *UAS-mCherry-Fer2LCH*; *Fer2LCH^{NP4763-Gal4}*, *UAS-GFP-Fer1HCH* y *Fer2LCH^{NP2602-Gal4}*, *UAS-mCherry-Fer2LCH*, respectivamente. (a) Tinción con Azul de Coomasie en condiciones no reductoras. Las proteínas endógenas están denotadas por un solo asterisco. Especies de mayor peso molecular denotadas por tres asteriscos aparecen en los últimos tres carriles incluyendo en el genotipo *Fer1HCH^{G188/+}*. (b) Tinción con Azul de Prusia en condiciones no reductoras. Extractos proteicos de los genotipos anteriores se cargaron en el gel. A excepción de *Fer1HCH^{G188/+}* los únicos complejos multimericos que almacenan hierro son aquellos que incorporan las subunidades endógenas.

Una pregunta evidente era si la inserción de mCherry afectaba el proceso de plegamiento de las subunidades de ferritina y por ende la formación del complejo funcional. Para validar esta línea de pensamiento se generaron las siguientes moscas transgenicas: *UAS-GFP-*

Fer1HCH en esta línea GFP se insertó en la misma posición que se encuentra en las moscas *Fer1HCH^{G188}*. Las moscas *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4, UAS-GFP-Fer1HCH* no produjeron complejos de ferritina cargados con hierro en donde hubiera subunidades H etiquetadas con GFP derivadas del transgene *UAS-GFP-Fer1HCH*, este genotipo acumulo complejos de ferritina endógenos (Figura 13). La siguiente figura representa una hipótesis que explica como la temporalidad en la expresión de *UAS-GFP-Fer1HCH* y *UAS-mCherry-Fer2LCH* es la causa por la cual no se observan complejos de ferritina con estos monomeros fusionados. La hipótesis anterior se validó y los experimentos planteados, así como la lógica detrás pueden ser revisados (Rosas-Arellano et al., 2016)

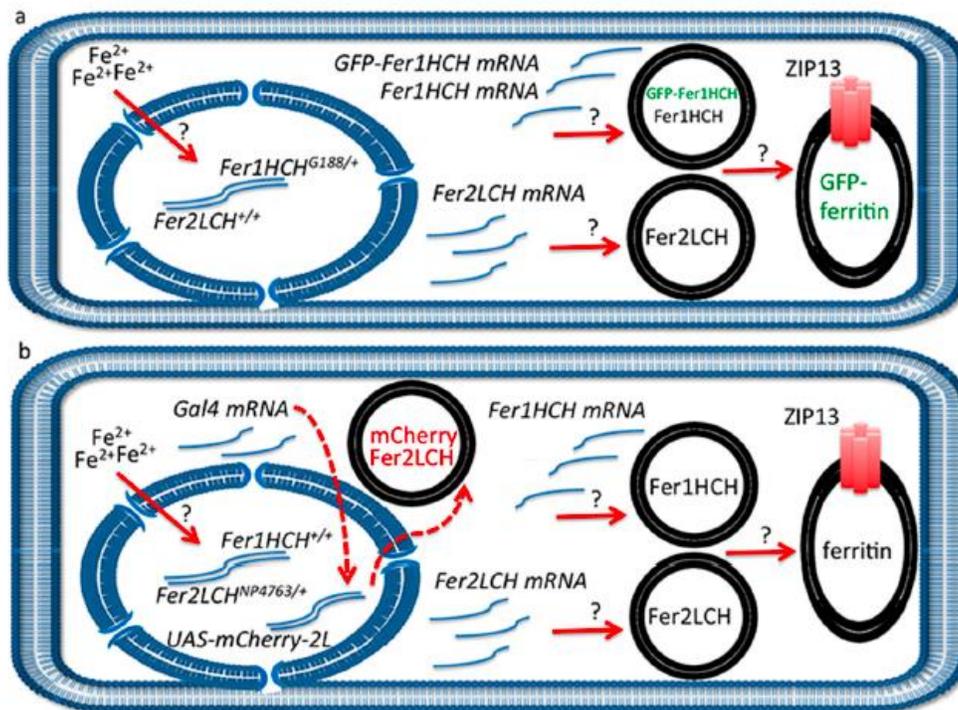


Figura 14. (a) Representación esquemática de un enterocito en la región anterior, una hora después del pulso de hierro de la cepa *Fer1HCH^{G188/+}*. Las células sienten el hierro en el citosol, se induce la transcripción de las subunidades de ferritina en tandem, dos vesículas están presentes unas contienen subunidades *Fer2LCH* endógenas, otras *Fer1HCH* y *GFP-Fer1HCH*. Estas subunidades se ensamblan rápidamente para formar un complejo 24 mer. En la vía secretora el transportador ZIP13 media el transporte de hierro a las vesículas. (b)

Representación esquemática de un enterocito en la región anterior una hora después del pulso de hierro de la cepa *Fer2LCH^{NP4763}-Gal4, UAS-mCherry- Fer2LCH*. Igual que en la representación anterior las células sensan el hierro en el citosol, se induce la transcripción de las subunidades Fer1HCH y Fer2LCH únicamente, también hay inducción del factor de transcripción Gal4 que migra hacia el núcleo para reconocer la secuencia UAS. Cuando inicia el proceso de ensamblaje únicamente las subunidades Fer1HCH y Fer2LCH endógenas son incorporadas al complejo y las subunidades L etiquetadas con mCherry no se incorporan. Tiempo después cuando se sintetizan las subunidades mCherry-Fer2LCH no quedan subunidades H con que interactuar o el proceso ha concluido. Por lo que se observan vesículas con distinta localización subcelular.

3. JUSTIFICACIÓN

Para ejercer su función biológica la mayoría de las proteínas se ensamblan en complejos, ya sea en forma de homómeros (múltiples copias de un solo tipo de subunidad) o heterómeros (dos o más cadenas polipeptídicas distintas). Para formar los complejos las subunidades deben interactuar eficientemente de forma específica y dinámica. La ferritina es un heteropolímero compuesto por dos subunidades que en *D. melanogaster* se ensambla por 12 dímeros Fer1HCH-Fer2LCH. Actúa como almacén intracelular para regular los niveles de hierro y proteger a las células del exceso del mismo. Debe existir una cooperación estructural entre ambas subunidades mediada por interacciones inter e intra subunidad. Acercamientos previos que estudiaron el mecanismo de ensamblaje de ferritina valiéndose de etiquetas de proteínas fluorescentes incorporadas a la secuencia endógena de una de las subunidades que codifican para la proteína Fer1HCH^{G188} sugieren que en un evento previo a la formación del complejo las subunidades H y L se encuentran en compartimentos subcelulares distintos. Sin embargo el uso del sistema Gal4/UAS para mediar la inducción de la construcción mCherry-Fer2LCH trajo consigo un problema de retraso temporal que impidió la incorporación eficiente de estas subunidades en los complejos endógenos de ferritina. Debido a lo anterior y para visualizar el proceso de ensamblaje *ex vivo* en tiempo real, proponemos utilizar una nueva construcción mKate2-Fer2LCH generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9 que incorpora una proteína fluorescente a la secuencia endógena de *Fer2LCH*. Con esto buscamos elucidar si las dos subunidades de ferritina son almacenadas y procesadas en diferentes compartimentos vesiculares antes de formar parte del complejo funcional final.

4. HIPÓTESIS

El ensamblaje de ferritina en el epitelio intestinal de *D. melanogaster* es un proceso gradual y regulado, en el cual las subunidades que conforman el complejo proteico son previamente procesadas en compartimentos subcelulares independientes.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Incorporar una etiqueta de proteína fluorescente a la secuencia endógena de *Fer2LCH* para visualizar el curso temporal del proceso de ensamblaje de ferritina *ex vivo*, mediante un modelo de inducción dependiente de hierro en el enterocito intestinal de larvas de *D. melanogaster*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Generar moscas *mKate2-Fer2LCH* mediante CRISPR-Cas9.
2. Obtener moscas transheterocigotas que contengan ambas subunidades de ferritina marcadas con etiquetas fluorescentes distintas.
3. Inducir la expresión de ferritina tras un pulso de hierro y cultivar intestinos de larvas de *D. melanogaster ex vivo* para obtener imágenes en tiempo real del ensamblaje.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas de *Drosophila*.

Las diferentes cepas de *D. melanogaster* fueron mantenidas en alimento estándar que contiene: agar (6.5%), levadura (40.9%), piloncillo (51.2%), grenetina (1.1%) y ácido propiónico (0.1%). Se mantuvieron en una incubadora a 24°C. La cepa control fue la *white*⁺ isogénica construida en el laboratorio (Tejeda-Guzmán *et al.* 2018). La cepa *Fer1HCH*^{G188/+} es una línea transgénica que contiene la proteína verde fluorescente en la secuencia endógena del gen *Fer1HCH* (Missirlis *et al.* 2007). La cepa *w; +; Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP* _{TM6,Tb} estirpe A y B, es una línea transgénica creada por CRISPR-Cas9 recibida desde el Instituto de Enfermedades Genéticas en Francia por el Dr. Zvonimir Marelja. La cepa *y, w, P(y+ cre)* que expresa la *cre* recombinasa fue recibida del Dr. Ralf Stanewsky de la Universidad de Münster en Alemania. La cepa *Df(3R)fer/TM3, KrGFP, Sb* que deleta ambas subunidades de ferritina fue descrita previamente (Gutiérrez *et al.* 2013). La cepa doble balanceadora (Figura 21) se creó en el laboratorio previamente.

6.2 Geles de acrilamida en condiciones no reductoras.

Se recolectaron 30 moscas adultas de 3-5 días de nacidas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agregó 130 µL de buffer de lisis y se homogenizó con pistilos, se centrifugó a 14000 rpm 12 min a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se centrifugó a 5000 rpm 5 min a 4 °C y nuevamente se recolectó el sobrenadante. Se agregó buffer de carga correspondiente a la mitad del sobrenadante colectado. Se prepararon geles de poli(acrilamida) al 6% (H₂O, 30 % mix de acrilamida, 1.5 M Tris pH 8.8, 10 % SDS, 10 % persulfato de amonio, TEMED). Del extracto anterior se cargaron dos geles en paralelo, uno con 25 µL por carril y otro con 10 µL por carril. Los geles se corrieron a 80V durante 1 hora. Finalizada la corrida. El gel cargado con 10 µL de extracto por carril se incubó en solución de fijación (30 % etanol, 10 % ácido acético) durante 4 horas en agitación, posteriormente se incubó con Azul de Coomassie toda la noche. Se realizaron tres lavados con agua Mili-Q y

se reveló. El gel cargado con 25 µL de extracto por carril se incubó con Azul de Prusia (2% hexacyanoferrato de potasio y 2% HCl) durante 4 horas en agitación posteriormente se realizaron tres lavados con agua Mili-Q y se dejó toda la noche. Al día siguiente se tomó la fotografía.

6.3 Imágenes por microscopía.

Se disectaron intestinos de larvas en tercer estadio (crecidas en distintas dietas descritas en el texto) de las cepas i) *white⁺* ii) *w; +; $\frac{Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP}{TM6,Tb}$* y iii) *Fer1HCH^{G188/+}* en PBS al 1X. Se fijaron con Paraformaldehído al 4% durante 20 minutos en frío. Después se lavaron con PBS 1X tres veces y se agregó una gota de medio de montaje VECTASHIELD con DAPI. Todas las muestras fueron observadas en el microscopio confocal LEICA TCS SP8 (Lanse Cinvestav).

6.4 Extracción de ADN

Se colocaron 20 moscas en un tubo eppendorf de 1.5mL a 4 °C, se homogenizaron con un pistilo en 100 µL de Buffer A (100 mM Tris HCL PH 7.6, 100 mM EDTA ,100 mM NaCl y 0.5% SDS) posteriormente se incubaron 15 minutos en hielo. Se añadió 200 µL de 1.5 M KAc y se mezcló en vortex. Se incubó durante 10 minutos a 4 °C. Enseguida se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos en temperatura ambiente. Se transfirió 250 uL del sobrenadante a un nuevo tubo. Se añadió 150 µL de isopropanol y se mezcló en vortex. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el botón celular con 70 % de Etanol. Se dejó evaporar el Etanol durante 10 minutos y finalmente se resuspendió el botón celular en 30 µL de agua DEPC. Se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro de microgota NanoDrop® ND-1000 (Lanse Cinvestav).

6.5 Reacciones de PCR.

Diseño se oligonucleótidos

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para verificar las regiones N y C-terminal de la construcción *mKate2-Fer2LCH*.

Secuencia	Dirección
5'-CAGTAAACCGTCGACATG-3'	1_Forward
5'-GCCGTACATGAAGCTGGTAG-3'	2-Reverse
5'-GCTCAGGGTCTAGTGAATATTG-3'	3_Forward
5'-CTGCTTCTGCAGATACTCG-3'	4_Reverse

Tabla. Oligonucleótidos diseñados para verificar las regiones N y C-terminal de la construcción *mKate2-Fer2LCH*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador marca *Veriti de Applied Biosystems*. Los productos de PCR se amplificaron con Taq-Polimerasa Platinum de *Invitrogen* bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 94 °C por 2 minutos. Posteriormente 30 ciclos: Desnaturalización 94 °C por 30 segundos , alineamiento 55 °C por 30 segundos y extensión 72 °C 1 min/kb.

6.6 Reacción de ligación.

Se aislaron los productos de PCR de 2.8 kb con el kit *QIAquick Gel Extraction*. Se cuantificaron en un espectrofotómetro de microgota NanoDrop® ND-1000 (Lanse Cinvestav). La reacción de ligación se preparó en hielo con los siguientes componentes: inserto 37.5 ng, vector 50 ng (pJet 1.2) , buffer de exonucleasa 2 µL, T4 ligasa 1µL . El

volumen de reacción final se llevó a 20 µL. En un tubo de 1.5 mL se adicionaron todos los componentes. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Al terminar la incubación se inactivó la enzima con calor a 65 ° C durante 10 minutos. Se transformó 5 µl de reacción en 50 µl de células XL10-Gold® ultracompetentes.

6.7 Transformación Bacteriana.

Se añadió 5 µl de reacción de ligación a 50 µl de células XL10-Gold® ultracompetentes. Se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se hizo un choque térmico de 42 °C por 45 segundos. Se incubó en hielo 2 minutos. Se añadió 450 uL de medio LB sin antibiótico. Se incubó 37 °C durante 1 hora. Al final se sembró en placas LB con ampicilina y se dejó toda la noche en incubación a 37 °C. Al día siguiente se picaron colonias positivas y se sembraron en medio líquido.

7. RESULTADOS

7.1 Curso temporal de la inducción de ferritina en la parte media del intestino de larvas de *D. melanogaster*.

Con la finalidad de observar el curso temporal de la expresión de ferritina en el intestino de *Drosophila* tras un pulso de hierro, larvas en tercer estadio de la cepa Fer1HCH^{G188/+} se alimentaron durante 20 minutos en una dieta suplementada con 1mM de citrato de amonio férrico, se disectaron los intestinos y se tomaron imágenes por microscopía confocal a una magnificación de 5x. 2 horas después del pulso de hierro hay expresión de GFP-Ferritina únicamente en la región de hierro y en las células de cobre (Figura 15 A). 4 horas después del pulso de hierro aparece GFP-Ferritina en la región anterior (Figura 15 B) Este resultado es similar al obtenido en Missirlis *et al* 2007, antes de 4 horas no hay inducción de ferritina en la región anterior, en contraste 4 horas después del pulso el complejo está ensamblado y almacena el exceso de hierro proveniente de la dieta.

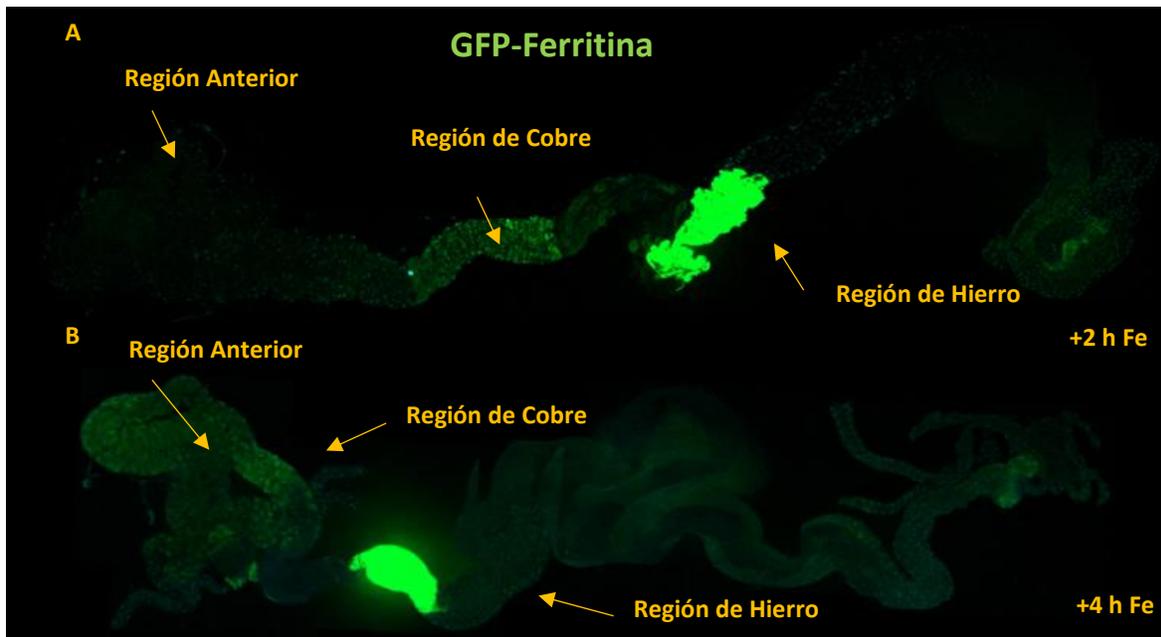


Figura 15. Curso temporal de la inducción de GFP-Ferritina en el intestino de larvas de tercer estadio de la cepa *Fer1HCH^{G188/+}*. La expresión de GFP-Ferritina es constitutiva en la región de hierro y 4 horas después del pulso de hierro se induce en la región anterior. Imagen reconstruida a partir de una serie de imágenes tomadas en el microscopio confocal.

Realizando una magnificación de 40x a las distintas regiones del intestino de *Drosophila* podemos observar como las células responden de manera diferente al hierro. En la Figura 16 en verde está marcado GFP-Ferritina y en azul con DAPI los núcleos de los enterocitos. La región de hierro expresa abundantemente GFP-Ferritina aún en ausencia del metal en concordancia con lo reportado por Betti *et al.*, 2009. Las células de cobre expresan GFP-Ferritina hacia la periferia y en la región anterior expresan GFP-ferritina pocas células enteroendocrinas pero no hay expresión en los enterocitos (Figura 16 A-C). Cabe señalar que estos complejos están probablemente vacíos de hierro pues el metal ha sido depletado previamente con el quelante BPS. En larvas crecidas en 1 mM de FAC observamos que la expresión de GFP-Ferritina prevalece en la región de hierro estas células expresan ferritina constitutivamente, en las células de cobre disminuye la expresión de GFP-Ferritina pero en

la región anterior hay inducción de GFP-Ferritina, aquí los complejos se ensamblan para almacenar el exceso de hierro (Figura 16 D-F).

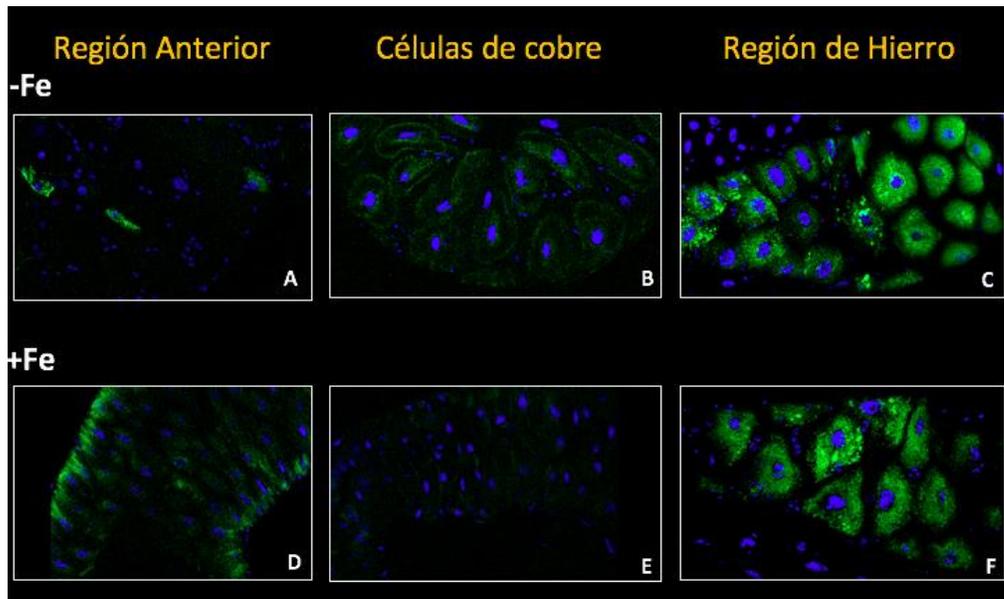


Figura 16. Enterocitos de la región anterior (A, D), zona de cobre (B, E) y región de hierro (C, F) tienen expresión diferencial de ferritina en presencia (1 mM FAC) o ausencia (200 μ M BPS) del hierro. Las dos células GFP-positivas en el panel A son enteroendocrinas. Los enterocitos en la región anterior expresan GFP-Ferritina cuando la larva se alimenta con alta concentración de hierro como se observa en el panel (D). En verde está marcado GFP-Ferritina y en DAPI los núcleos de los enterocitos. Magnificación 40x.

7.2 Diseño de la construcción *mKate2-Fer2LCH* por la técnica de edición CRISPR-Cas9.

Para seguir estudiando la dinámica de la síntesis de ferritina en *Drosophila*, específicamente el tráfico e interacción de las subunidades a nivel subcelular antes de generar el complejo, se generará una nueva herramienta genética: *mKate2-Fer2LCH*. En esta construcción la proteína roja fluorescente mKate2 de 26 kDa se insertará en la secuencia endógena del gen *Fer2LCH* que codifica para la subunidad L. Esta herramienta se generará por la técnica de edición genética CRISPR-Cas9. Teniendo como antecedente la proteína fusión GFP-Ferritina, se optó por insertar la proteína fluorescente mKate2 en una posición equivalente N-

terminal en el gen de *Fer2LCH*. La Figura 17 representa un esquema de la construcción *mKate2-Fer2LCH* diseñada. El locus de *Fer2LCH* es en el tercer cromosoma del genoma de *Drosophila*, posee 3 exones y 2 intrones. La inserción de *mKate2* se hizo en el exón 1 después del sitio de corte del péptido señal predicho.

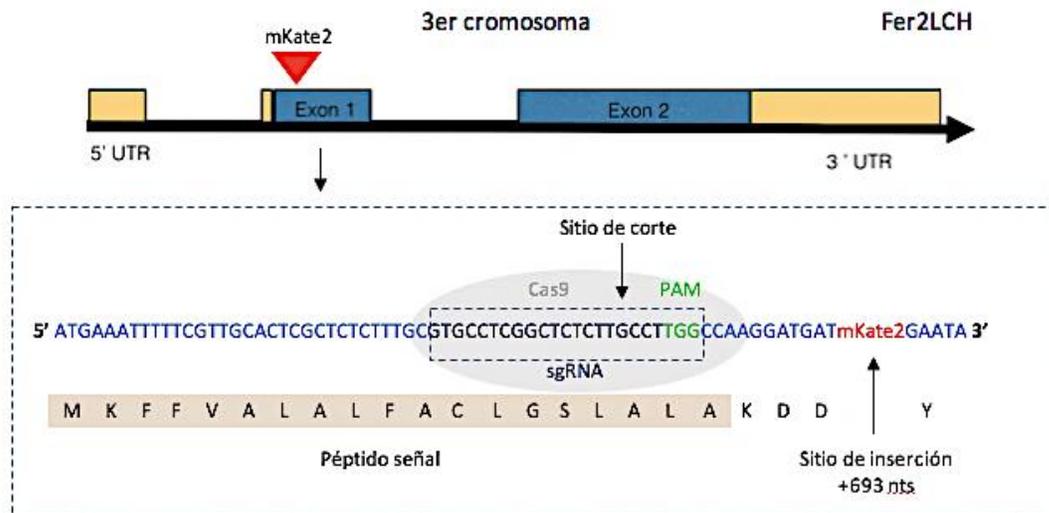


Figura 17. Construcción de *mKate2-Fer2LCH* por CRISPR-Cas9. La inserción de *mKate2* es en el primer exón del gen de *Fer2LCH*. Se muestra también el sgRNA, la secuencia PAM y el péptido señal que dirige la proteína a la vía secretora.

CRISPR-Cas9 requiere un RNA guía único (sgRNA) que contiene una secuencia dirigida (crRNA) y una secuencia de reclutamiento de Cas9 (tracrRNA). La región crRNA es una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a una región en el gen de interés que dirige la actividad de Cas9. El 3' de la secuencia crRNA contiene un motivo adyacente proto-espaciador o PAM (5'-NGG-3') donde N es cualquier nucleótido. Cas9 escinde aproximadamente 3 pares de bases río arriba de esta secuencia. En la Figura 17 se muestra el sgRNA específico para *Fer2LCH* junto con la secuencia PAM, el sitio de corte aproximado de la nucleasa Cas9 y el sitio de inserción deseado para la proteína fluorescente *mKate2*. La inserción de *mKate2* en la secuencia endógena del gen de *Fer2LCH* se logra por recombinación homóloga dirigida. Cas9 genera una ruptura de la doble hélice. Tanto en procariontes como en eucariontes existen dos vías de reparación principales 1) unión de

extremos no homólogos (NHEJ) y 2) recombinación homóloga dirigida (HDR). En la primera vía los extremos rotos se unen sin necesidad de un molde que diriga la reparación. La segunda vía requiere de una secuencia homóloga para guiar la reparación. Dado que requiere una plantilla (plásmido donador) este se usa para introducir el gen reportero mKate2. La ruptura en la secuencia de *Fer2LCH* genera dos regiones adyacentes al sitio de corte, denominadas brazos homólogos 5' y 3' que funcionan como plantilla. Estas secuencias se subclonaron en el plásmido 954_p950_mini-white_mKate2 para generar el plásmido donador (Figura 18).

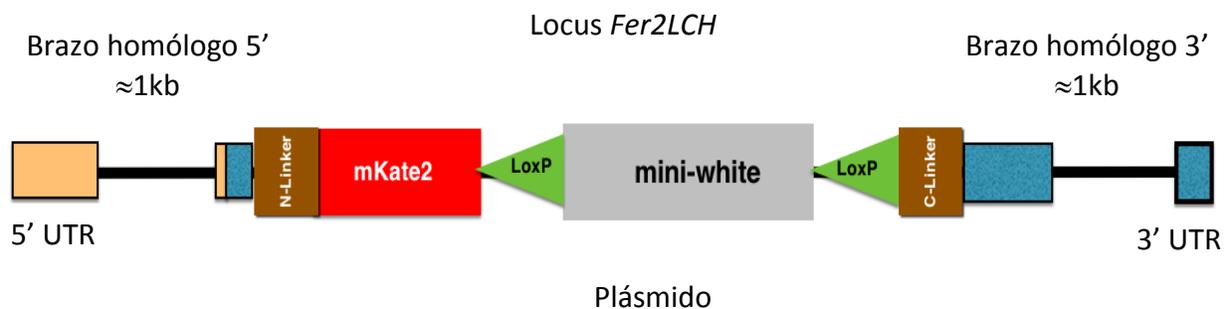


Figura 18. Plásmido donador usado para incorporar la etiqueta fluorescente mKate2. Donde el N-linker es de 30 pb, mKate2 693 pb, sitios LoxP 34 pb, mini-white 2064 pb y el C-linker de 27 pb. Respective brazos homólogos 5' y 3'.

El diseño experimental del CRISPR-Cas9 y la generación del plásmido donador se realizó en el Instituto Imagine de Enfermedades Genéticas con nuestro colaborador el Dr. Zvonimir Marelja. El sgRNA y el plásmido donador se enviaron para ser inyectados en un embrión de cepa *white* junto con la nucleasa Cas9. De los embriones sobrevivientes que llegaron a moscas se seleccionaron moscas color ojo rojo que habían incorporado el plásmido donador con el gen *miniwhite*. Se obtuvieron dos moscas transgénicas, se mantuvieron y se amplió el stock. En nuestro laboratorio recibimos moscas provenientes de estas dos estirpes denominadas A y B. El resto de los experimentos se realizaron con estas moscas de ojo rojo con genotipo $w; +; \frac{Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP}{TM6,Tb}$.

7.3 Verificación de la inserción de mKate2 en el locus de Fer2LCH.

Para visualizar la subunidad L etiquetada con la proteína fluorescente mKate2, se disectaron intestinos de larvas en tercer estadio crecidas en dieta normal provenientes de las estirpes A y B. En ninguno de los experimentos se observó la fluorescencia de mKate2 en el locus de *Fer2LCH*. Una manera rápida y sencilla de verificar la inserción de mKate2 en el locus de *Fer2LCH* fué hacer la cruce entre moscas A y B con moscas del genotipo *Df(3R)Fer/TM3, Kr-GFP*. Esta línea tiene una delección de 2.2 Kb en ambos genes de ferritina: *Fer1HCH* y *Fer2LCH*. La lógica detrás del experimento fué que si mKate2 se había incorporado en el locus de *Fer2LCH* al cruzarlas estas moscas generarían una ruptura en este gen y no habría descendencia del genotipo $w;+; \frac{Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP}{Df(Fer)}$, puesto que *Fer2LCH* es vital para el desarrollo embrionario y larval. En la Figura 19, se cuantificó la progenia de los cuatro posibles genotipos. El genotipo $w;+; \frac{Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP}{Df(Fer)}$ fué letal mostrando que ambas cadenas de ferritina están afectadas. Este resultado confirma indirectamente la inserción de mKate2 en la secuencia endógena de *Fer2LCH*.

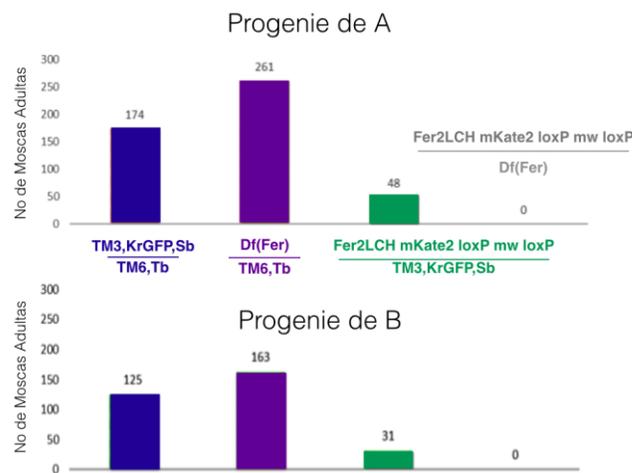


Figura 19. Cuantificación de la progenie en las estirpes A y B. El genotipo $w;+; \frac{Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP}{Df(Fer)}$ es letal pues ambas cadenas de ferritina están afectadas en este cromosoma.

7.4 Eliminación del gen *mini-white* del locus *Fer2LCH*.

Para eliminar el gen *mini-white* del locus de *Fer2LCH*, moscas A y B se cruzaron con moscas que expresaban la proteína Cre recombinasa con genotipo: $yw (y+cre); +; \frac{D}{TM3,Sb}$. En este sistema la proteína reconoce los sitios loxP adyacentes al gen *mini-white*, dado que estos sitios tienen la misma orientación, la secuencia del gen *mini-white* se escinde como una pieza circular de ADN. Después de la cruce parental se realizaron las siguientes cruza F1 y F2 para aislar el cromosoma recombinado. En F2 se tomaron machos con la inserción de *mKate2* en el locus de *Fer2LCH* y se cruzaron individualmente con hembras vírgenes doblemente balanceadas. Se realizaron 10 eventos individuales para A y 8 eventos individuales para B.

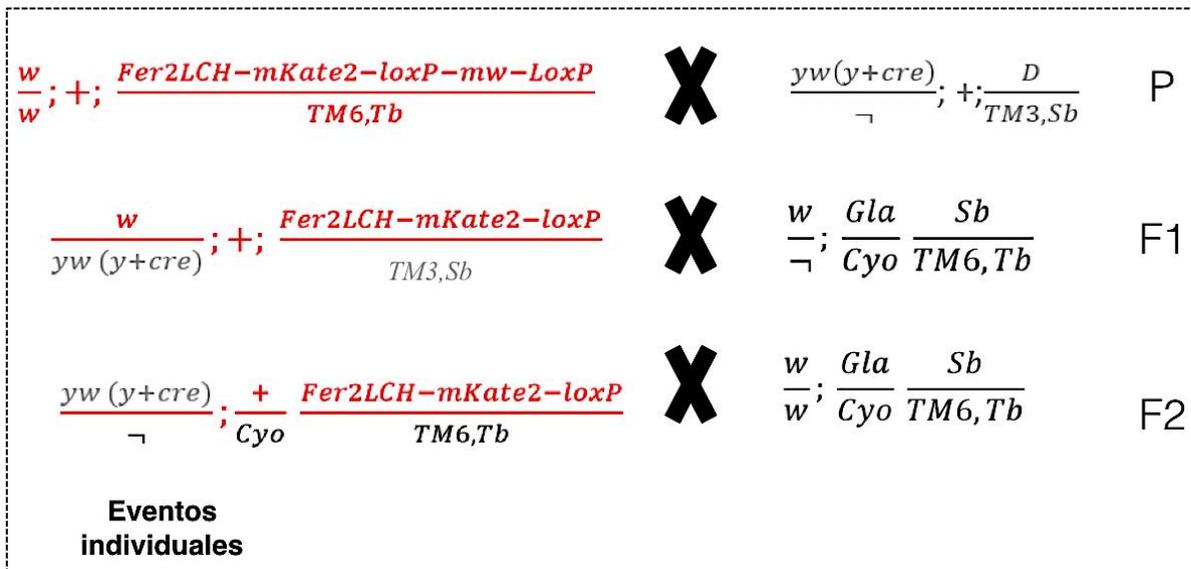


Figura 20. Esquema de cruza para eliminar el gen *mini-white* del locus de *Fer2LCH*.

7.5 Identificación de complejos de ferritina fusionados.

Para determinar si se generaban complejos funcionales a partir de monómeros L etiquetados con *mKate2* después de la escisión de *mini-white*, extractos proteicos de larvas silvestres, larvas *Fer1^{HCHG188/+}* y larvas *mKate2-Fer2LCH* se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras. Para revelar complejos proteicos el gel se tiñó

con solución Azul de Coomassie y para revelar ferritinas cargadas con hierro el gel se tiñó con solución Azul de Prusia (Figura 21).

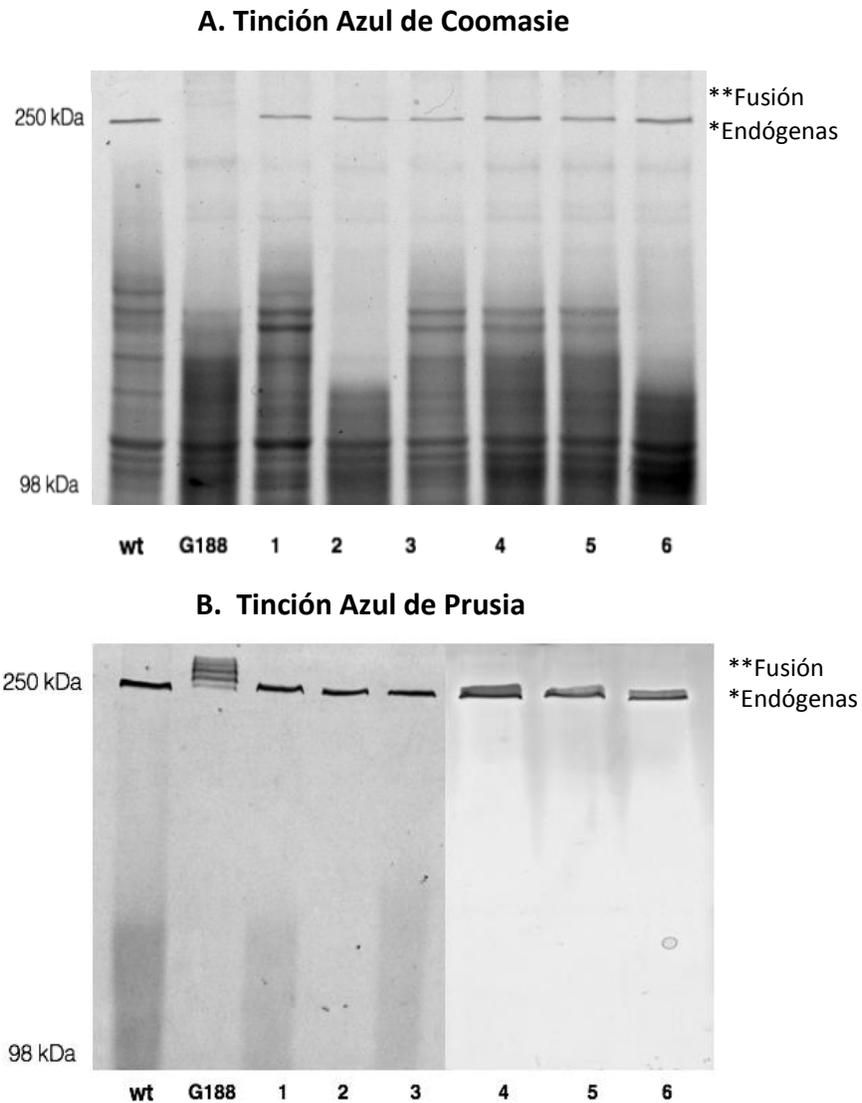


Figura 21. Determinación de complejos funcionales cargados con hierro. Extractos proteicos de larvas silvestres, larvas *Fer1^{HCHG188/+}* (control positivo) y larvas *mKate2-Fer2LCH* (progenie de 6 eventos individuales posterior a la escisión de *mini-white*, 3 derivados de A y 3 de B) se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras. A) Tinción con Azul de Coomassie y B) Tinción con Azul de Prusia.

En la imagen anterior, se muestra un gel representativo con tinción Azul de Coomassie, los carriles etiquetados 1-6 representan 3 eventos individuales en A y 3 eventos individuales en B pues de un total de 18 cruces individuales todas dieron el mismo resultado. En ninguna de las 6 líneas se observaron bandas de mayor peso molecular que hicieran referencia a complejos funcionales con diferentes proporciones de monómeros L marcados con mKate2. Los controles silvestre y *Fer1^{HCHG188/+}* migraron con un peso molecular esperado. Un gel revelado en paralelo y teñido con Azul de Prusia mostró que la mayoría de los complejos que almacenan hierro son además complejos formados únicamente por subunidades endógenas (Figura 21).

7.6 Secuenciación

Hasta este punto todos los experimentos realizados sugerían fuertemente que las moscas *mKate2-Fer2LCH* solo expresaban complejos endógenos por lo que se decidió mandar a secuenciar ADN amplificado de estos animales para verificar las regiones N y C-terminal de la construcción. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, estos flanqueaban las regiones denotadas en la Figura 22.

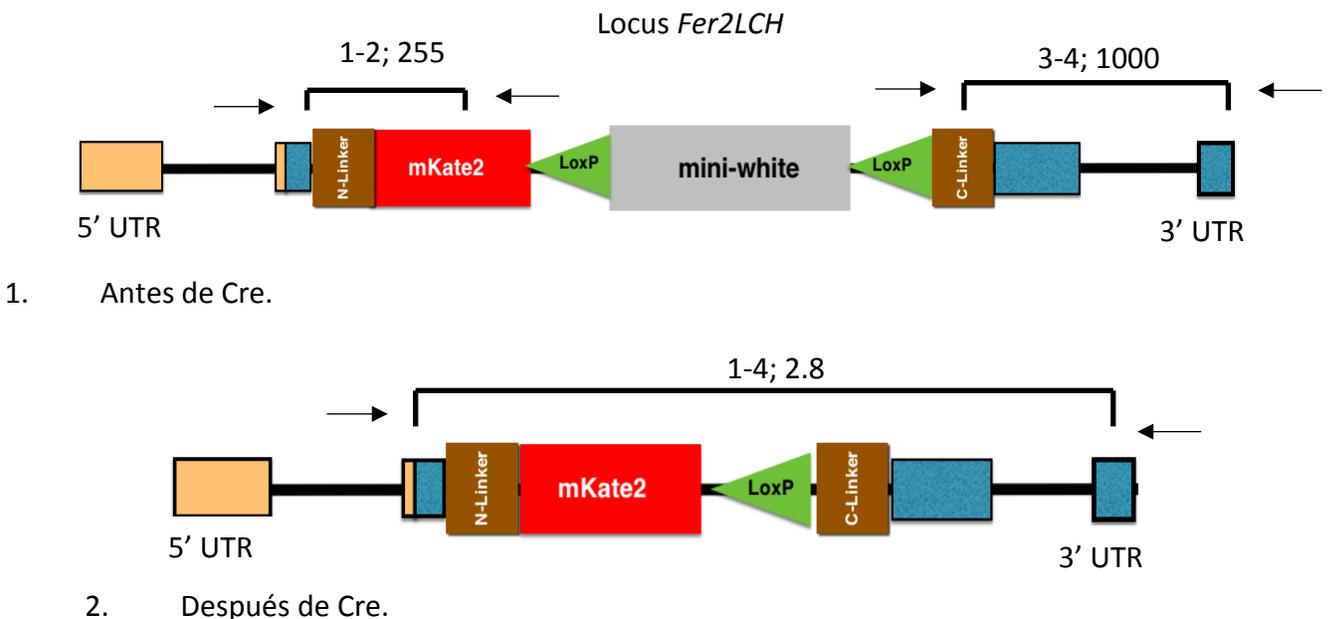


Figura 22. Localización de los oligonucleótidos diseñados para verificar la construcción *mKate2-Fer2LCH*.

Se extrajo DNA de larvas *w; +; $\frac{Fer2LCH-mKate2-loxP-mw-loxP}{TM6,Tb}$* provenientes de ambas estirpes antes del evento Cre y se realizó una PCR punto final para amplificar los productos 1-2 y 3-4. Los fragmentos fueron amplificados con Taq polimerasa siguiendo las especificaciones del proveedor. Los tamaños esperados eran de 255 pb: para el amplicón 1-2 y 1000 para el amplicón 3-4 (Figura 23).

En las dos estirpes se amplificaron ambos fragmentos, esto fue indicativo de un locus genómico modificado pues en la porción N-terminal había rastros de la secuencia de mKate2 y en la porción C-terminal indicios de la secuencia LoxP, derivadas del plásmido donador.

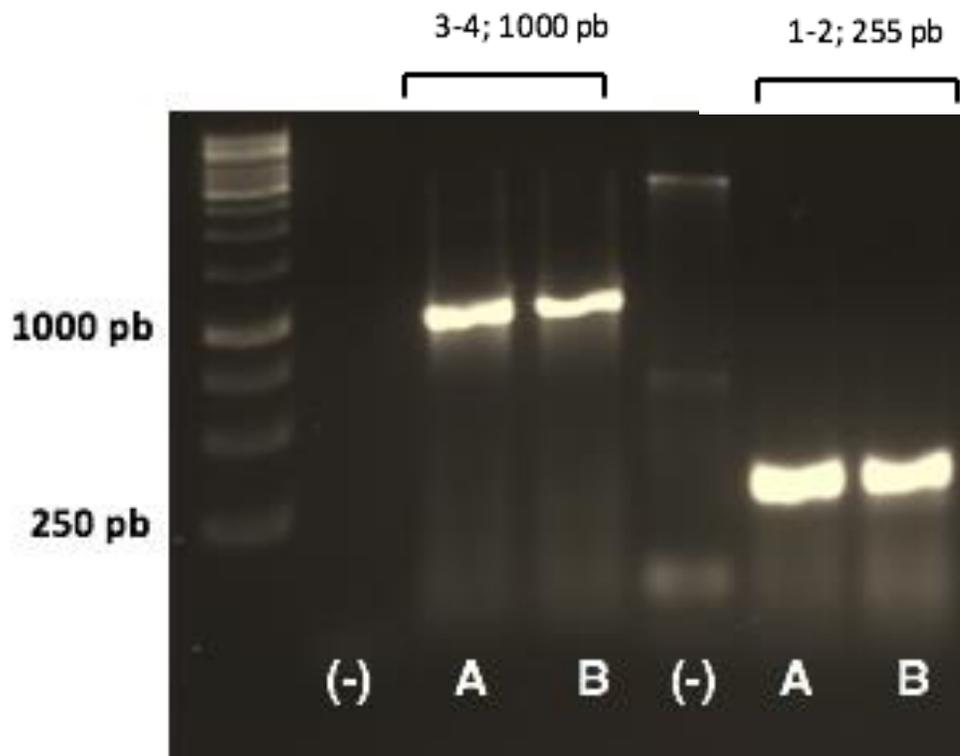


Figura 23. Productos de PCR amplificados antes del evento Cre en moscas A y B. Gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 1 kb Gene Ruler. 250 ng de DNA en cada carril.

Se extrajo también DNA de larvas $w; +; \frac{Fer2LCH-mKate2-loxP}{TM6,Tb}$ (después del evento Cre) y se realizó una PCR punto final con Taq polimerasa siguiendo las especificaciones del proveedor para amplificar el fragmento 1-4 de aproximadamente 2.8 kb. En moscas derivadas de la estirpe A se amplificó el fragmento 1-4 con el peso molecular esperado, el gel es representativo de 3 eventos después del Cre. Para la estirpe B el resultado fué igualmente consistente, por lo que se decidió usar una sola línea de moscas A después del evento Cre para mandar a secuenciar (Figura 24).

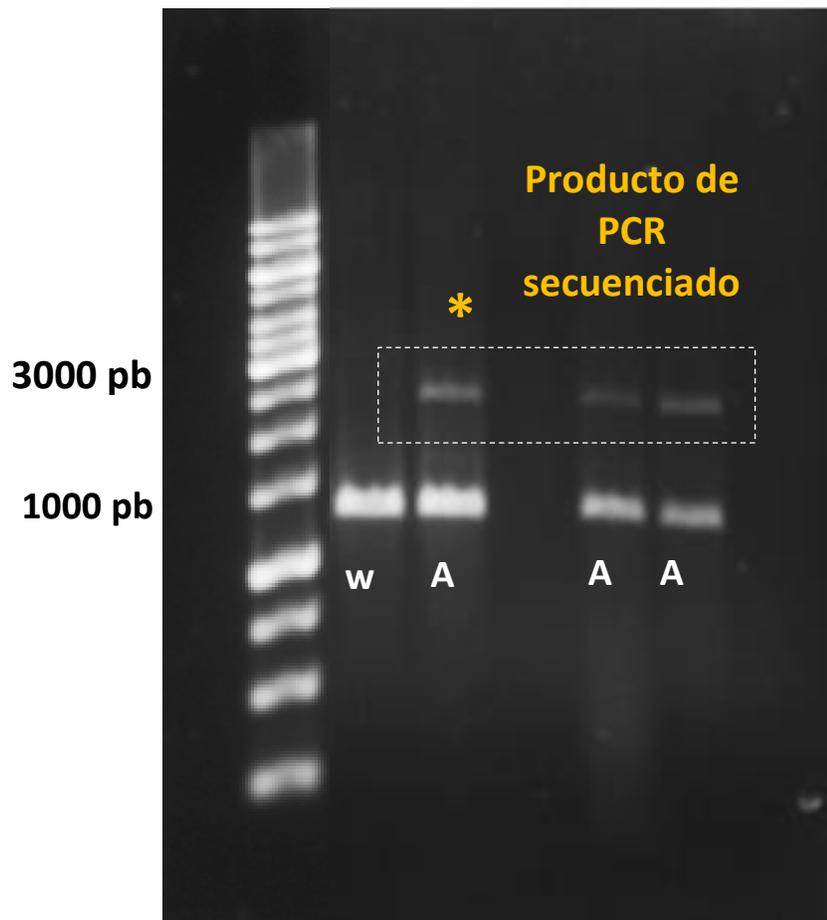


Figura 24. Productos de PCR amplificados después del evento Cre. La banda de 2.8 kb se seleccionó por análisis, la banda de 1000 pb proviene del cromosoma TM6,Tb del gen *Fer2LCH* silvestre. Gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular de 1 kb Gene Ruler. 250 ng de DNA en cada carril.

Se realizaron varias reacciones de PCR de la línea A1 para concentrar la cantidad de DNA amplificado. Posteriormente se aislaron las bandas de 2.8 kB con el kit *QIAquick Gel Extraction* de QIAGEN. Este producto de PCR se clonó en el plásmido pJET 1. 2, bacterias XL10-Gold® ultracompetentes se transformaron con este plásmido, después de la selección de colonias positivas, se extrajo el plásmido con el kit *QIAprep Spin Miniprep* y se envió a secuenciación. El siguiente recuadro muestra las secuencias obtenidas:

```

>pJet 1-4 (clona 3) pJet1.2 Fw
GAAGCCGAAAACCTCGGGGAAGGCTCGAGTTTTTCAGCAGGGGATCGGGGTTCTGCAGATACTCGTCGAAAGGTT
TTTTAAAAAGGGCTGGGTCTGGGGGACCTTCATCAACTGCCGAGGTCGTTGGCATAGCCGGACAGCTTGCGCA
CGCTCTCGGCCTGCTTGCCAGGAAGTTCTCCTCGAAATAATGGGCCAGCTCGGGATCCCTCTCGGCGTCGGTG
GCGTGGGTGGCACGGGAGTGCACGTGAGTGGCTCCGGTGGCCAGCTGCTTCTCGGTGTCCAAAGCCAGAAGCC
AGGGAATGCATTCCGCCACCTCAAAGTGCCGCGCTTGGTGCTACGAAGCCGAAAACCTCGTGGCGGGGTTGA
AATCAACAATTCCTCCGCAACGGTTTCTTGCTGATCAGGCCATGCTGTCCCCAAGGGACGGCCAAAAATCC
CCGGTACACCCTCGGAAACCGGGCGGGTTTTTCGGTAGGATTAATAATGGTGGGCCCCCGAAGAACCTACCAAT
TGGCAAATTGCCTTAATTAGGACGGATTCC

> pJet 1-4 (clona 3) pJet1.2 Rv
TAGAAGGGGGGAAGCCGAATGAGGAACCTCTAGAAGACCGGCGAGGGAATTTTTCGTTGCATCGCTCTTTTGA
AAGGATCGGCTCTTTGGCCAAGGATGATAGTTCGGGGTCCAGCGGTTCTTCAGGCAGTTCGTGAGCGAGCTG
ATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAACAACCACTTCAAGTGCACATCCGA
GGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTC
GCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGAC
TTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCCACCATACGAAGACGGGGGCGTGCTGAC
CGTACCCAGGACACCAGCCCCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACCTCCCA
TCCCAACGGGCCCTGTGATGCAAAAAAAACACTCGGGCTGGGAAGGCCTTCACCGAGACCCCTGTACCCCG
GCTGACGGCGGCCCTGGAAGGGCAGAGCCCGACATGGCCCTGAAAGCTTCGGGGGGGGGGGGGCCACCTG
AATCTGCAACTTGGAAAAACCCCTACGGATTCCAAGAAAACCCGCCTAAAAAACCCCAAAAATGCCCGGGG
CCTACTATGGTGGGACAAA

```

Figura 25. Resultados de la secuenciación de los productos de PCR. Regiones 5' y 3' del fragmento 1-4.

Con las secuencias recibidas se hizo un blast contra el locus modificado de *Fer2LCH* posteriormente se hizo la traducción de los marcos abiertos de lectura con la herramienta expasy/ (<https://web.expasy.org/translate/>). En la Figura 26 en azul aparece la secuencia genómica endógena y la secuencia aminoacídica de la subunidad L. Los primeros dos aminoácidos del péptido señal no están presentes en la secuencia obtenida. Enseguida aparecen 4 aminoácidos FFVA, pero los dos aminoácidos subsecuentes se substituyen por

SLSLK que no está presente en la secuencia endógena y hacia la parte final del péptido señal todo indica estar bien, río abajo comienza la fusión con la proteína mKate2 y la secuencia sigue siendo la misma. Por el contrario en la región 3' del fragmento 1-4 se amplificó un fragmento muy grande en el exón 2, río abajo de la fusión Lox-P-C-linker-Exón 2. La secuencia reveló solo parte del gen endógeno de *Fer2LCH* y con los datos obtenidos no podemos todavía verificar el locus modificado de *Fer2LCH* específicamente en el punto de interés que es en su unión con la secuencia *mKate2*.

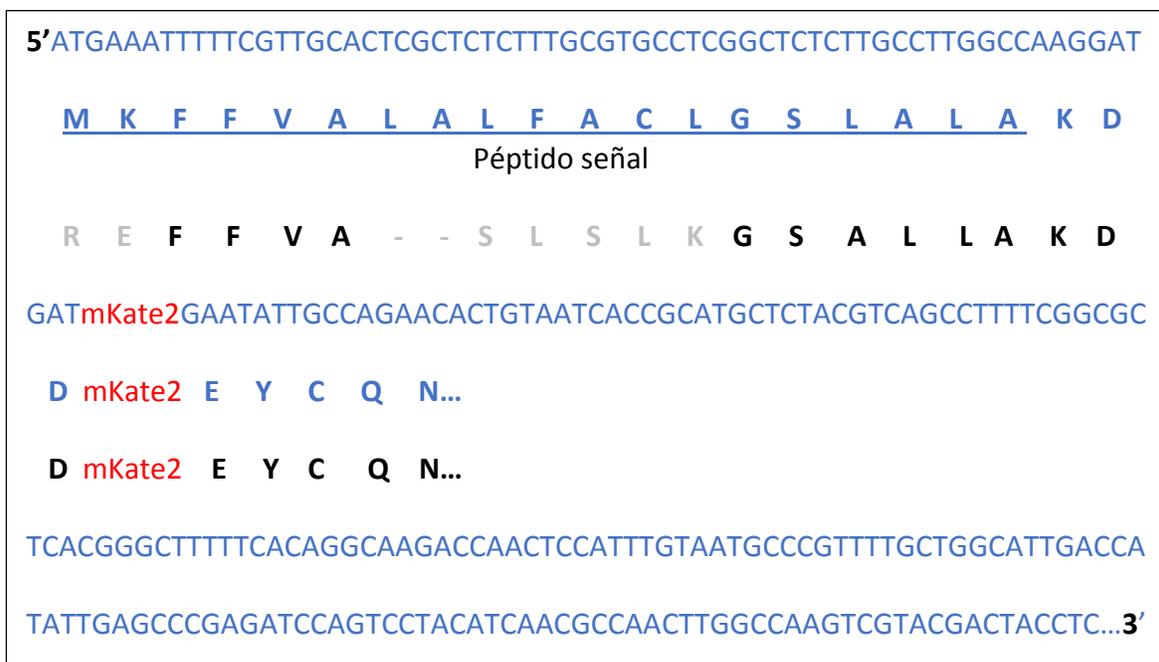


Figura 26. Comparación de las secuencias obtenidas por secuenciación y la secuencia endógena de *Fer2LCH*. La proteína endógena posee 227 aminoácidos. La proteína fusión esperada posee una longitud de 492 aminoácidos. Región 5' del fragmento 1-4.

8. DISCUSIÓN

Los complejos de proteínas son cruciales para una gran cantidad de procesos biológicos (Pieters et al., 2016) (Marianayagam et al., 2004) (Teichmann y Marsh 2017). En los últimos años se han estudiado los procesos por los cuales las proteínas se ensamblan en complejos, esto ocurre generalmente a través de vías ordenadas que tienden a conservarse evolutivamente (Levy et al, 2008). Sin embargo, aún se desconoce como las células modulan el correcto ensamblaje. En *Drosophila*, el ensamblaje de ferritina es un proceso gradual y altamente regulado (Missirlis et al., 2007) (Rosas-Arellano et al., 2016). No obstante, se requiere más información para entender la secuencia completa de eventos posteriores a la entrada de hierro en los enterocitos. Desde los primeros estudios de la homeostasis del hierro en *Drosophila*, se sabe que ferritinas cargadas con hierro se encuentran en la vía secretora (Poulson *et al*, 1952, Locke *et al*, 1984) aún así se desconoce cómo los enterocitos sensan el hierro y cuál es el factor de transcripción que induce la transcripción de los genes *Fer1HCH* y *Fer2LCH* (Dunkov y Georgieva, 1999).

El intestino medio de *Drosophila*, al igual que su contraparte de mamífero, es un tejido complejo compuesto por varios tipos de células que realizan diversas funciones, como la digestión, la absorción de nutrientes y la producción de hormonas (Hung et al., 2018) (Lemaitre y Aliaga, 2013). De experimentos anteriores y observaciones hechas en esta tesis de maestría sabemos que en la parte media del intestino de *Drosophila* específicamente en la región de hierro la expresión de ferritina es constitutiva (Figura 14 panel C y F). Aquí las células expresan ferritina independientemente de los niveles intracelulares de hierro (Mehta et al., 2009). Esto apunta a un mecanismo independiente al sistema IRP-1A/IRE que controla la transcripción de las subunidades de ferritina en el intestino de *Drosophila*. A través de diferentes promotores y splicing alternativo en el 5'UTR del pre-RNA de *Fer1HCH* se generan diferentes transcritos que dan lugar a un total de 5 isoformas (Gallardo-Hernández y Missirlis, 2020). Algunos de estos transcritos son más cortos y no poseen IRE (Lind *et al*, 1998). El pre-mRNA de *Fer2LCH* también genera 5 diferentes transcritos con dos

isoformas (*Flybase*). Los diferentes transcritos podrían tener una función tejido-específica que confiere al organismo la ventaja de poder regular la expresión de ferritina (Lind et al., 1998). Estudiar como los transcritos contribuyen al metabolismo de hierro es parte de las perspectivas de este proyecto de investigación. Actualmente existe basta información de single cell RNA-seq que buscamos analizar en este contexto, para ello proponemos generar y caracterizar mutantes por CRISPR-Cas9. Algo importante de mencionar es que hemos identificado putativamente una nueva isoforma con localización subcelular citosólica, por lo que proponemos realizar un análisis genético, purificación, cristalización y resolución de la estructura atómica de esta proteína.

En la parte media del intestino también se encuentran las células de cobre que secretan ácido, presentes tanto en larvas como en adultos (Strasburger *et al*, 1932), fueron nombradas así por acumular cobre radioactivo proveniente de la dieta (Poulson y Bowen, 1952). Poseen similitudes con las células parietales gástricas en mamíferos (Filshie y Waterhouse, 1955) En la Figura 14 panel B y E se observa expresión de GFP-Ferritina con y sin hierro añadido. Ya se ha reportado que las células de cobre secretan ferritina cargada con hierro en el lumen intestinal cuando hay altas concentraciones de hierro (Poulson y Bowen, 1952). En bajas concentraciones de hierro estas células también podrían estar secretando ferritina con el hierro intracelular remanente o bien estar incorporado ferritina transportada en la hemolinfa pues el hierro puede ser movilizado de su reserva de ferritina, presumiblemente para ser utilizado en otras partes del cuerpo de *Drosophila* (Mandilaras et al., 2013; Mehta et al., 2009; Tang y Zhou, 2013). Por otro lado, la región anterior del intestino de *Drosophila* despliega una respuesta casi inmediata al recibir altas concentraciones de hierro dietético (Missirlis *et al* 2007, Rosas Arellano *et al*, 2016). En esta región las células sintetizan ferritina rápidamente para que el exceso de hierro se almacene en la cavidad de este complejo multimérico (Figura 14 D). Sin embargo, aún se desconoce dónde se ensamblan los heteropolímeros. En la Figura 14 A en ausencia de hierro pocas células en la región anterior expresan GFP-Ferritina, estas células no son enterocitos. Este hallazgo no está reportado, pero ha sido observado previamente por el Dr. Helge

Uhrigshardt (Uhrigshardt *et al.* 2013). Probablemente esta población represente a células enteroendocrinas. Una función importante de las células enteroendocrinas es sensor el contenido en el lumen intestinal el cuál modula la liberación de hormonas peptídicas que regulan la ingesta de nutrientes (Spreckley, 2015). Estos productos pueden actuar localmente de manera paracrina, pueden activar otras células enteroendocrinas u otro tipo de células en el tracto digestivo alcanzando blancos distantes al liberar sus productos en el torrente sanguíneo (Worthington *et al.*, 2018). En la región anterior estas células podrían recibir información del lumen intestinal cuando hay deficiencia de hierro, es por ello que es interesante caracterizar también el tráfico de la ferritina en esta población celular. Si lo anterior ocurre, quiere decir que existe un sistema homeostático en las células de la mosca que determina las concentraciones de hierro en el tejido periférico (Mandilaras *et al.*, 2013)(Mehta *et al.*, 2009). A manera de determinar la verdadera identidad de estas células proponemos cruzar moscas de genotipo *Fer1HCH^{G188}*, *UAS-stinger RFP/ TM3*, *Sb* con los drivers *Gal4-Escargot* y *Gal4-Voila*; marcadores de células intestinales troncales y células enteroendocrinas para tomar imágenes en alta resolución de la localización subcelular de las subunidades H y L.

La herramienta GFP-Ferritina ha permitido la visualización dinámica de las subunidades H en la región anterior del intestino de *Drosophila* donde hay inducción tras un pulso de hierro dietético (Missirlis *et al.*, 2007). A pesar de ello debido a la diferencia que existe en la regulación temporal de la expresión de ambas subunidades de ferritina, una nueva construcción como *mKate2-Fer2LCH* permitiría seguir estudiando el tráfico subcelular de las dos subunidades por separado (Rosas-Arellano *et al.*, 2016). Con los experimentos realizados demostramos que hubo incorporación del plásmido donador en el locus endógeno de *Fer2LCH* puesto que las moscas tienen un fenotipo de ojo rojo Figura 8, Figura 22. Después de mandar a secuenciar los productos de PCR para verificar la proteína fusión en la región N y C-terminal concluimos que en la porción C-terminal es necesario diseñar un nuevo par de oligonucleótidos que nos permitan amplificar y obtener la secuencia genómica justo después de la unión del sitio loxP-C-linker y el exón dos de *Fer2LCH*. Por otro lado, en

la porción N-terminal los resultados de la secuenciación indican que el inicio del marco de lectura de Fer2LCH está alterado (Figura 25). Como en otras especies, en *Drosophila* la frecuencia de mutagénesis por NHEJ es más alta que HDR por uno o dos órdenes de magnitud (Harrison et al., 2014; Mohr et al., 2016). El desarrollo de enfoques para resolver este problema está en progreso; sin embargo, aún no existe un método universal y eficiente para aumentar la frecuencia de activación (Beumer et al., 2013; Chu et al., 2015; Maruyama et al., 2015). El otro par de oligonucleótidos que se propone irá dirigido nuevamente a la porción N-terminal para verificar específicamente la fusión L-mKate2. No obstante se consideró inyectar nuevos embriones de la cepa *white* con el plásmido donador diseñado para obtener más organismos transgénicos. Una vez que recibamos las moscas buscaremos obtener moscas transheterocigotas que contengan ambas subunidades de ferritina marcadas con etiquetas fluorescentes para posteriormente inducir la expresión de ferritina tras un pulso de hierro y así obtener imágenes en tiempo real del ensamblaje.

9. CONCLUSIONES

1. Las distintas poblaciones celulares del intestino de *Drosophila* exhiben una expresión diferencial de GFP-Ferritina en respuesta al hierro dietético.
2. En la región anterior hay inducción de GFP-Ferritina 4 horas después de un pulso de hierro dietético. Antes de este tiempo GFP-Ferritina tiene expresión constitutiva en la región de hierro. Esta porción del intestino de *Drosophila* representa un buen modelo que permite estudiar el ensamblaje de ferritina en respuesta al hierro. Proceso que ocurre de manera gradual y está altamente regulado.

3. La herramienta GFP-Ferritina ha demostrado recapitular la expresión intracelular de las subunidades H endógenas, esto nos ha permitido visualizar de manera dinámica una parte del proceso de ensamblaje en la región anterior. No obstante, debido a la diferencia que existe en la regulación temporal de la expresión de ambas subunidades de ferritina, es necesario seguir trabajando en la caracterización de la herramienta genética *mKate2-Fer2LCH*. Esta herramienta nos permitirá estudiar con mayor detalle la cooperación y tráfico entre ambas subunidades antes de formar parte del complejo.

4. Con la construcción *mKate2-Fer2LCH* fué posible modificar el locus endógeno de *Fer2LCH* por CRISPR-Cas9, sin embargo no se logró generar una proteína que fuera funcional. Identificamos que existen errores en la lectura hacia la región N-terminal en los primeros 20 aminoácidos. Se optó por realizar más inyecciones de embriones de cepa *white* con la finalidad de aumentar la probabilidad de lograr una correcta inserción en el locus endógeno.

10.REFERENCIAS

- Abu-omar, M. M., Loaiza, A., & Hontzeas, N. (2005). Reaction Mechanisms of Mononuclear Non-Heme Iron Oxygenases. <https://doi.org/10.1021/cr040653o>
- Anderson, C., Shen, L., & Leibold, E. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1893(9), 1468–1483. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Arosio, P., Elia, L., & Poli, M. (2017). Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, 69(6), 414–422. <https://doi.org/10.1002/iub.1621>
- Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., & Iwai, K. (2011). Distinct Mechanisms of Ferritin Delivery to Lysosomes in Iron-Depleted and Iron-Replete Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(10), 2040–2052. <https://doi.org/10.1128/mcb.01437-10>
- Bai, L., Xie, T., Hu, Q., Deng, C., Zheng, R., & Chen, W. (2015). Genome-wide comparison of ferritin family from Archaea, Bacteria, Eukarya, and Viruses: Its distribution, characteristic motif, and phylogenetic relationship. *Science of Nature*, 102(9). <https://doi.org/10.1007/s00114-015-1314-3>
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K., & Carroll, D. (2013). Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(4), 657–664. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005439>
- Blanc, S. Le, Garrick, M. D., & Arredondo, M. (2019). Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism, 1780–1785. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00080.2012>
- Bradley, J. M., Moore, G. R., & Le Brun, N. E. (2017). Diversity of Fe²⁺ entry and oxidation in ferritins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.027>
- Campillos, M., Cases, I., Hentze, M. W., & Sanchez, M. (2010). SIREs: Searching for iron-responsive elements. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2), 360–367. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq371>
- Chen, Y., Li, Y., Wei, J., & Li, Y. Y. (2014). Transcriptional regulation and spatial interactions of head-to-head genes. *BMC Genomics*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-519>
- Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 33(5), 543–548. <https://doi.org/10.1038/nbt.3198>
- Cohen, L. A., Gutierrez, L., Weiss, A., Leichtmann-Bardoogo, Y., Zhang, D. L., Crooks, D. R., ... Meyron-Holtz, E. G. (2010). Serum ferritin is derived primarily from macrophages

- through a nonclassical secretory pathway. *Blood*, 116(9), 1574–1584. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253815>
- De Domenico, I., Vaughn, M. B., Li, L., Bagley, D., Musci, G., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2006). Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO Journal*, 25(22), 5396–5404. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601409>
- Deshpande, C. N., Ruwe, T. A., Shawki, A., Xin, V., Vieth, K. R., Valore, E. V., ... Jormakka, M. (2018). Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nature Communications*, 9(3075), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05446-4>
- Dittmer, N. T., & Kanost, M. R. (2010). Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.006>
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., ... Zon, L. I. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter, 403(February).
- Drakesmith, H., Chen, N., Ledermann, H., Sreaton, G., Townsend, A., & Xu, X. N. (2005). HIV-1 Nef down-regulates the hemochromatosis protein HFE, manipulating cellular iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11017–11022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504823102>
- Dunkov, B. C., & Georgieva, T. (1999). Organization of the ferritin genes in *Drosophila melanogaster*. *DNA and Cell Biology*, 18(12), 937–944. <https://doi.org/10.1089/104454999314791>
- Dunkov, B., & Georgieva, T. (2006). Insect iron binding proteins: Insights from the genomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4 SPEC. ISS.), 300–309. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.007>
- Edward, Solomon, Serra Goudarzi, S. K. (2016). O₂ activation by non-heme iron enzymes. *Biochemistry*, 55(46), 6363–6374. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Filshie, B. K., & Waterhouse, D. F. (1955). U L T R a S T R U C T U R E of the Copper- a C C U M U L a T I N G Region of the *Drosophila Larval M I D G U T*. *Tissue & Cell*, 3(1), 77–102. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=18631544&retmode=ref&cmd=prlinks%0Apapers3://publication/uuid/7871849C-38E3-4A9F-8B0C-73FC72E89AE2>
- Finazzi, D., & Arosio, P. (2014). Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration. *Archives of Toxicology*, 88(10), 1787–1802. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1329-0>
- Garrick, M. D., Dolan, K. G., Horbinski, C., Ghio, A. J., Higgins, D., Porubcin, M., ... Garrick, L.

- M. (2003). DMT1 : A mammalian transporter for multiple metals, *1*, 41–54.
- Georgieva, T., Dunkov, B. C., Dimov, S., Ralchev, K., & Law, J. H. (2002). *Drosophila melanogaster* ferritin: cDNA encoding a light chain homologue, temporal and tissue specific expression of both subunit types. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*(3), 295–302. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00090-X)
- González-Morales, N., Mendoza-Ortiz, M. Á., Blowes, L. M., Missirlis, F., & Riesgo-Escovar, J. R. (2015). Ferritin is required in multiple tissues during *drosophila melanogaster* development. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133499>
- Goralska, M., Nagar, S., Fletsher, L. N., & McGahan, M. C. (2005). Differential degradation of ferritin H- and L-chains: Accumulation of L-chain-rich ferritin in lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(10), 3521–3529. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0358>
- Guaraldo, M., Santam, P., Rovelli, E., Savino, A. D., Saglio, G., Cittaro, D., ... Levi, S. (2016). Characterization of human mitochondrial ferritin promoter: identification of transcription factors and evidences of epigenetic control. *Nature Publishing Group*, (September), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep33432>
- Hagen, W. R., Hagedoorn, P. L., & Honarmand Ebrahimi, K. (2017). The workings of ferritin: A crossroad of opinions. *Metallomics*, *9*(6), 595–605. <https://doi.org/10.1039/c7mt00124j>
- Hamburger, A. E., West, A. P., Hamburger, Z. A., Hamburger, P., & Bjorkman, P. J. (2005). Crystal structure of a secreted insect ferritin reveals a symmetrical arrangement of heavy and light chains. *Journal of Molecular Biology*, *349*(3), 558–569. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.074>
- Harrison, M. M., Jenkins, B. V, Connor-giles, K. M. O., & Wildonger, J. (2014). Genes Dev.-2014-Harrison-1859-72_CRISP. *Genes and Development*, *28*, 1859–1872. <https://doi.org/10.1101/gad.248252.114>.Freely
- Harrison, P. M. (1986). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF FERRITIN. *Biochemical Education*, *14*(4), 154–162.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell*, *142*(1), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.028>
- Hung, R.-J., Hu, Y., Kirchner, R., Li, F., Xu, C., Comjean, A., ... Perrimon, N. (2018). A Cell Atlas of the Adult *Drosophila* Midgut. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3259138>
- Huynh, N., Ou, Q., Cox, P., Lill, R., & King-jones, K. (2019). Glycogen Branching Enzyme controls cellular iron homeostasis via Iron Regu- latory Protein 1 and mitoNEET. *Nature Comunication*, *10*(5463).
- Iliadi, K. G., Avivi, A., Iliadi, N. N., Knight, D., Korol, A. B., Nevo, E., ... Boulianne, G. L. (2008).

- nemy encodes a cytochrome b561 that is required for *Drosophila* learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 19986–19991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810698105>
- Jellinger, K., Paulus, W., Grundke-Iqbal, I., Riederer, P., & Youdim, M. B. H. (1990). Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section*, *2*(4), 327–340. <https://doi.org/10.1007/BF02252926>
- Jensen, F. B. (2009). The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: Oxygen carriers and regulators of local blood flow. *Journal of Experimental Biology*, *212*(21), 3387–3393. <https://doi.org/10.1242/jeb.023697>
- Jin, Y., He, J., Fan, K., & Yan, X. (2019). Ferritin variants: Inspirations for rationally designing protein nanocarriers. *Nanoscale*, *11*(26), 12449–12459. <https://doi.org/10.1039/c9nr03823j>
- Kamyshev, N. G., Iliadi, K. G., Bragina, J. V., Kamysheva, E. A., Tokmatcheva, E. V., Preat, T., & Savvateeva-Popova, E. V. (2002). Novel memory mutants in *Drosophila*: Behavioral characteristics of the mutant nemyP153. *BMC Neuroscience*, *3*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-3-9>
- Kato, J., Fujikawa, K., Kanda, M., Fukuda, N., Sasaki, K., Takayama, T., ... Niitsu, Y. (2001). A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *American Journal of Human Genetics*, *69*(1), 191–197. <https://doi.org/10.1086/321261>
- Lemaitre, B., & Miguel-Aliaga, I. (2013). The Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics*, *47*(1), 377–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133343>
- Lind, M. I., Ekengren, S., Melefors, Ö., & Söderhäll, K. (1998). *Drosophila* ferritin mRNA: Alternative RNA splicing regulates the presence of the iron-responsive element. *FEBS Letters*, *436*(3), 476–482. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01186-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01186-7)
- Lind, M. I., Missirlis, F., Melefors, Ö., Uhrigshardt, H., Kirby, K., Phillips, J. P., ... Rouault, T. A. (2006). Of two cytosolic aconitases expressed in *Drosophila*, only one functions as an iron-regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(27), 18707–18714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603354200>
- Mackenzie, E. L., Iwasaki, K., Tsuji, Y., & Al, M. E. T. (2008). Comprehensive Invited Review, *10*(6). <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1893>
- Mandilaras, K., Pathmanathan, T., & Missirlis, F. (2013). Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients*, *5*(5), 1622–1647. <https://doi.org/10.3390/nu5051622>
- Marelja, Z., Leimkühler, S., & Missirlis, F. (2018). Iron sulfur and molybdenum cofactor enzymes regulate the *Drosophila* life cycle by controlling cell metabolism. *Frontiers in Physiology*, *9*(FEB), 1–31. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00050>

- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). The power of two: Protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(11), 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.09.006>
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., & Russell, M. J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*, 6(11), 805–814. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1991>
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M., Bilate, A. M., Ingram, J. R., & Ploegh, H. L. (2015). Inhibition of non-homologous end joining increases the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise [TM: inserted] genome editing. *Nature*, 33(5), 538–542. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>.Inhibition
- Mehta, A., Deshpande, A., Betti, L., & Missirlis, F. (2009). Ferritin accumulation under iron scarcity in *Drosophila* iron cells. *Biochimie*, 91(10), 1331–1334. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.05.003>
- Millholland, J. M., Fitch, J. M., Cai, C. X., Gibney, E. P., Beazley, K. E., & Linsenmayer, T. F. (2003). Ferritoid, a tissue-specific nuclear transport protein for ferritin in corneal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23963–23970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210050200>
- Miret, S., Simpson, R. J., & McKie, A. T. (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110341>
- Missirlis, F., Holmberg, S., Georgieva, T., Dunkov, B. C., Rouault, T. A., & Law, J. H. (2006). Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*, 103(15), 5893–5898.
- Missirlis, F., Kosmidis, S., Brody, T., Mavrakis, M., Holmberg, S., Odenwald, W. F., ... Rouault, T. A. (2007). Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. *Genetics*, 177(1), 89–100. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.075150>
- Mohr, S. E., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B. E., Viswanatha, R., & Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *FEBS Journal*, 283, 3232–3238. <https://doi.org/10.1111/febs.13777>
- Morgan, E. H., & Oates, P. S. (2002). Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Absorption, 29, 384–399. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0578>
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., & Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15050–15055. <https://doi.org/10.1073/pnas.261408198>
- Natan, E., Wells, J. N., Teichmann, S. A., & Marsh, J. A. (2017). Regulation, evolution and consequences of cotranslational protein complex assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 42, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.11.023>

- Outten, F. W., & Theil, E. C. (2009). Iron-based redox switches in biology. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(5), 1029–1046. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2296>
- Paul, V. D., & Lill, R. (2015). Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(6), 1528–1539. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.018>
- Pham, D. Q. D., & Winzerling, J. J. (2010). Insect ferritins: Typical or atypical? *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1800*(8), 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.004>
- Pieters, B. J. G. E., Van Eldijk, M. B., Nolte, R. J. M., & Mecinović, J. (2016). Natural supramolecular protein assemblies. *Chemical Society Reviews*, *45*(1), 24–39. <https://doi.org/10.1039/c5cs00157a>
- Ponka, P., & Nam, C. (1999). The transferrin receptor : role in health and disease, *31*.
- Poulos, T. L. (2014). Heme enzyme structure and function. *Chemical Reviews*, *114*(7), 3919–3962. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>
- Rafnin, S. B., Woo, C. H., Roost, K. T., Price, D. C., & Sciamm, R. (1974). Intestinal Absorption of Hemoglobin Iron-Heme Cleavage by Mucosal Heme Oxygenase, *54*(December), 1344–1352.
- Raynes, R., Pomatto, L., & Davies, K. (2016). Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med*, *50*(1), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Rockfield, S., Chhabra, R., Robertson, M., Rehman, N., Bisht, R., & Nanjundan, M. (2018). Links between iron and lipids: Implications in some major human diseases. *Pharmaceuticals*, *11*(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ph11040113>
- Rosas-Arellano, A., Vásquez-Procopio, J., Gambis, A., Blowes, L. M., Steller, H., Mollereau, B., & Missirlis, F. (2016). Ferritin assembly in enterocytes of drosophila melanogaster. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms17020027>
- Schlottmann, F. (2017). Duodenal cytochrome b (Cybrd1) ferric reductase functional studies in cells, 1389–1393. <https://doi.org/10.1039/c7mt00254h>
- Shayeghi, M., Latunde-dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., ... Hall, M. (2005). Identification of an Intestinal Heme Transporter, *122*, 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.025>
- Shi, H., Bencze, K., & Philpott, C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin Haifeng. *Science*, *320*(5880), 1207–1210.
- Single-molecule, W. W., Gunshin, H., Mackenzie, B., & Berger, U. V. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *388*(July), 6264–6268.

- Southon, A., Farlow, A., Norgate, M., Burke, R., & Camakaris, J. (2008). Malvolio is a copper transporter in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, *211*(5), 709–716. <https://doi.org/10.1242/jeb.014159>
- Spreckley, E. (2015). The L-cell in nutritional sensing and the regulation of appetite. *Frontiers in Nutrition*, *2*(July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00023>
- Surguladze, N., Patton, S., Cozzi, A., Fried, M. G., & Connor, J. R. (2005). Characterization of nuclear ferritin and mechanism of translocation, *740*, 731–740.
- Tandy, S., Williams, M., Leggett, A., Lopez-jimenez, M., Dedes, M., Ramesh, B., ... Sharp, P. (2000). Nramp2 Expression Is Associated with pH-dependent Iron Uptake across the Apical Membrane of Human Intestinal Caco-2 Cells *, *275*(2), 1023–1029.
- Tang, X., & Zhou, B. (2013). Iron homeostasis in insects: Insights from *Drosophila* studies. *IUBMB Life*, *65*(10), 863–872. <https://doi.org/10.1002/iub.1211>
- Tiklová, K., Senti, K. A., Wang, S., GräCurrency Signslund, A., & Samakovlis, C. (2010). Epithelial septate junction assembly relies on melanotransferrin iron binding and endocytosis in *Drosophila*. *Nature Cell Biology*, *12*(11), 1071–1077. <https://doi.org/10.1038/ncb2111>
- Torti, F. M., & Torti, S. V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, *99*(10), 3505–3516. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3505>
- Vashchenko, G., & Macgillivray, R. T. A. (2013). Multi-Copper Oxidases and Human Iron Metabolism, 2289–2313. <https://doi.org/10.3390/nu5072289>
- Vulpe, C. D., Kuo, Y., Murphy, T. L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., ... Anderson, G. J. (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse, *21*(february), 195–199.
- Wang, W., Knovich, M. A., Coffman, L. G., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2010). Serum Ferritin: Past, Present and Future. *Biochim Biophys Acta*, *1800*(8), 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.011>
- Wang, X., Yin, S., Yang, Z., & Zhou, B. (2018). *Drosophila* multicopper oxidase 3 is a potential ferroxidase involved in iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1862*(8), 1826–1834. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.017>
- Worthington, J. J., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2018). Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunology*, *11*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.73>
- Xiao, G., Liu, Z. H., Zhao, M., Wang, H. L., & Zhou, B. (2019). Transferrin 1 Functions in Iron Trafficking and Genetically Interacts with Ferritin in *Drosophila melanogaster*. *Cell Reports*, *26*(3), 748–758.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.053>
- Xiao, G., Wan, Z., Fan, Q., Tang, X., & Zhou, B. (2014). The metal transporter ZIP13 supplies iron into the secretory pathway in *Drosophila melanogaster*. *ELife*, *3*, e03191. <https://doi.org/10.7554/eLife.03191>

- Yoon, S., Cho, B., Shin, M., Koranteng, F., Cha, N., & Shim, J. (2017). Iron homeostasis controls myeloid blood cell differentiation in drosophila. *Molecules and Cells*, 40(12), 976–985. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0287>
- Yoshida, T., & Migita, C. T. (2000). Mechanism of heme degradation by heme oxygenase, 82, 33–41.
- Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B. C., Harizanova, N., Ralchev, K., & Law, J. H. (1999). Drosophila melanogaster transferrin and up-regulation on bacterial infection. *European Journal of Biochemistry*, 420, 414–420.
- Zhang, G., Winzerling, D., & J, J. (2006). Secreted ferritin : Mosquito defense against iron overload ? <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.12.001>