

Bertha Landeros Sánchez^{*1}

0000-0002-1293-2759

José A. Gutiérrez Pabello²

0000-0001-5801-5887

Gerardo E. Medina Basulto³

0000-0001-8338-8829

Tomás B. Rentería Evangelista⁴

0000-0002-1165-0055

Efrén Díaz Aparicio⁵

0000-0002-1669-1323

Sawako Oshima³

0000-0003-2302-8201

¹Laboratorio de Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California
Calzada Universidad 14418, Parque Industrial
Internacional Tijuana
22390, Tijuana, Baja California, México²Departamento de Inmunología y Microbiología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, 04510
Ciudad de México, México³Laboratorio de Biología Molecular⁴Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias
Universidad Autónoma de Baja California
km. 3.5 Carretera San Felipe
Fraccionamiento Campestre
Mexicali, Baja California, 21386, México⁵Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534
Col. Progreso, 62550, Jiutepec, Morelos, México***Autor para correspondencia:**

Tel: +52 664-265-4845

Correo electrónico:

bertha.landeros@uabc.edu.mx

El *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* disminuye la regulación de la expresión del ARNm de la ferroportina 1 en los macrófagos inducidos con hierro

Resumen

El *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la enfermedad de Johne. Los mecanismos por los cuales MAP es capaz de adaptarse a la respuesta natural del huésped aún no están claros. A través de la PCR en tiempo real, se examinaron los niveles de expresión del ARN de la ferroportina 1 (FPN1) en células de macrófagos de ratón J774 infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* o con el extracto crudo de proteína (ECP) de MAP. La multiplicidad de infección (MOI) con MAP dependió de la disminución de los niveles del ARNm de la FPN1. Los macrófagos infectados con las MOI de 20:1 y 15:1 no mostraron cambio alguno en la expresión del gen FPN1, mientras que en las MOI de 10:1 y 5:1, disminuyó en un 50% y 80%, respectivamente. En los macrófagos tratados con 50, 100, 150 y 200 µg/mL de ECP de MAP (ATCC19698), la expresión del ARNm de FPN1 disminuyó 25%. La sobreexpresión del ARNm de FPN1 en macrófagos J774 tratados con una sobrecarga de hierro de 400 µM de nitrilotriacetato férrico (FENTA) se suprimió cerca de un 70% por la infección con MAP viva (MOI 20:1). Estos datos revelaron que MAP inhibe la expresión del ARNm de FPN1, lo que sugiere que existe un mecanismo bacteriano que participa en la regulación del hierro del huésped.

Palabras clave: Expresión génica; Enfermedad de Johne; Ferroportina 1; Hierro; Macrófagos.

Introducción

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa caracterizada por causar diarrea y enterocolitis granulomatosa en rumiantes domésticos y silvestres. El *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) es el agente etiológico; este patógeno es capaz de infectar a los macrófagos entéricos y vivir de forma intracelular. Para multiplicarse dentro de las células del huésped, las bacterias requieren satisfacer sus demandas metabólicas específicas, entre ellas, de hierro —elemento clave que funciona como cofactor de muchas proteínas celulares que participan en el transporte de electrones, la desintoxicación de especies reductoras de oxígeno (ROS) y la síntesis de ADN (Eckelt *et al.*, 2014, 2015).

Recibido: 2015-10-12

Aceptado: 2016-03-16

Publicado: 2016-03-28

Información y declaraciones adicionales
en la página 10© Derechos de autor
Landeros Sánchez *et al.* 2016acceso abierto Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

El hierro no está disponible libremente, por lo tanto, las bacterias utilizan diferentes mecanismos de absorción para adquirirlo. Para ello, las bacterias producen sideróforos, hemóforos y receptores de superficie celular que capturan hemoproteínas (Krewulak y Vogel, 2008). En las micobacterias, la micobactina es una pseudobactina responsable de la unión y el transporte del hierro en las células. La micobactina es codificada por un grupo de genes denominados *mbtA-J* que inician su síntesis; en MAP el gen *mbtA* es más corto y codifica una versión incompleta de esta proteína. El truncamiento del gen *mbtA* puede explicar por qué MAP no es capaz de producir micobactina, por lo que es necesario agregarlo al medio de cultivo en el laboratorio (Li *et al.*, 2005).

A pesar de que *in vitro* se requiere micobactina, MAP sobreexpresa los genes implicados en la síntesis de micobactina en macrófagos bovinos (Zhu *et al.*, 2008). En presencia de hierro, el regulador transcripcional de MAP, el gen *IdeR*, reconoce secuencias consenso en regiones llamadas "cajas de hierro", localizadas en las regiones del promotor de genes encargadas de regular la expresión de genes implicados en la adquisición (*mbt*) y almacenamiento (*bfrA*) de hierro (Janagama *et al.*, 2009, 2010). Recientemente se caracterizó el interactoma de otro mecanismo de adquisición de hierro en MAP que depende del óxido nítrico (Lamont *et al.*, 2013).

La regulación de la homeostasis del hierro en los macrófagos involucra varias proteínas (Weiss, 2009). Los macrófagos pueden adquirir el hierro por medio del receptor de transferrina 1 (*tfr1*) y su captura está mediada por la transferrina. El hierro molecular puede obtenerse a través del transportador 1 (*Dmt1*) o por fagocitosis de los eritrocitos viejos. El hierro entonces se transporta, reutiliza y almacena en los macrófagos gracias a la interacción de elementos reguladores de hierro (IRES) con proteínas reguladoras del hierro (IRPS). La ferroportina 1 (*FPN1*) es una proteína de exportación de hierro que está presente en la superficie de los macrófagos, hepatocitos, enterocitos y eritrocitos y transporta la forma ferrosa del hierro (Fe^{2+}) (Abboud *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000). La salida de hierro de los macrófagos está controlada por la hepcidina, que interactúa con la *FPN1*. Esta interacción resulta en la internalización y degradación de la *FPN1* a través de los proteosomas, lo que bloquea el flujo de salida de hierro de los macrófagos (Nemeth *et al.*, 2004). La acumulación de hierro dentro del macrófago promueve el desarrollo de patógenos intracelulares y disminuye la secreción de IL-6 (Ganz, 2009). La expresión del ARNm de *FPN1* en los macrófagos aumenta con la infección de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y *Mycobacterium avium* (MA). Sin embargo, se obtuvo un incremento mayor en la expresión del ARNm del gen *fpn1* en MTB y de macrófagos infectados por MA cuando, de forma clásica, los macrófagos se activaron con interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) (Van Zandt *et al.*, 2008), aunque el efecto de MAP en la expresión del ARNm de *FPN1* aún no se comprende.

Tomando en cuenta las funciones y la importancia de la *FPN1* y del hierro durante la infección de MAP en los macrófagos, se hipotetizó que se necesita una alta concentración de hierro para la sobrevivencia de las micobacterias en los macrófagos durante el proceso de infección; por lo tanto, la expresión del ARNm de *FPN1* debería estar disminuida para facilitar el establecimiento de la infección.

En este estudio, se examinaron los niveles de expresión del ARNm de *FPN1* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en la línea celular de macrófagos de ratón J774. Para ello, se infectaron los macrófagos con MAP vivo, con o sin hierro y con el extracto de proteína cruda de MAP, lo que permi-

tió identificar la inhibición de la expresión del ARNm de *FPN1* como efecto directo de MAP en macrófagos tratados con hierro.

Materiales y métodos

Cultivos bacterianos y extracto de proteína cruda

El MAP (ATCC 19698) se cultivó en medio Middlebrook 7H 9 suplementado con ácido oleico, albúmina, catalasa (OADC) (Difco, Detroit, MI, USA), dextrosa y micobactina (Allied Monitor Inc., USA) (4 mg/L) durante cuatro semanas. Las bacterias se almacenaron a -70°C en alícuotas de 1 mL con 4×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL en medio RPMI 1640 (Difco, Detroit, MI, USA), con L-glutamina, aminoácidos, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio (RPMI completo [CRPMI]), con glicerol al 10%. La dilución y plateo de bacterias en medio Middlebrook 7H 11 con agar, suplementado con OADC y micobactina, confirmó el número de bacterias. Se prepararon extractos de proteína cruda de MAP a partir de un cultivo de 50 mL de un mes de crecimiento. La suspensión bacteriana se centrifugó por 20 min a 3,000 X g, las bacterias se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en CRPMI. La suspensión se mezcló con sílice en una proporción de 1 g/mL durante 5 min y se centrifugó 20 min a 3,000 X g para eliminar restos celulares; el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m. Se aplicó el método de Bradford para determinar la concentración de proteínas de MAP del extracto filtrado. Las alícuotas del extracto de proteínas crudas se mantuvieron a -70°C hasta que se les utilizó.

Cultivo celular de macrófagos de ratón J774

La línea celular de los macrófagos de ratón J774 se propagó en CRPMI enriquecido con 5% de suero fetal bovino inactivado con calor, sin antibióticos. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO_2 . Los macrófagos se diluyeron con azul tripano y se cuantificaron mediante el uso de una cámara de Neubauer. Se sembraron 1×10^6 células por pocillo en cada placa de seis pozos. Los macrófagos se cultivaron a 37°C con 5% de CO_2 durante cuatro horas para permitir la adherencia a la superficie. Las células no adherentes se retiraron lavando con CRPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino. Los macrófagos adherentes se utilizaron para los experimentos posteriores.

Tratamiento de macrófagos con MAP vivo y con extracto de proteína cruda

Para identificar el efecto en la expresión del ARNm de *FPN1* del tratamiento del extracto de proteína cruda de MAP y MAP vivo, se pusieron a cultivar las placas con monocapas de 1×10^6 macrófagos infectados con MAP vivo o tratados con el extracto de proteína cruda de MAP. Para la infección, se utilizaron cuatro diferentes multiplicidades de infección (mois 5:1, 10:1, 15:1 y 20:1); después las placas se centrifugaron a 200 X g durante 10 min y se incubaron a 37°C durante seis horas. Para el tratamiento con proteína, los pocillos se incubaron con 50, 100, 150 o 200 μ g/mL de proteína cruda de MAP durante 6 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo de todos los tratamientos; las células se

lavarón una vez con PBS 1X, y se les extrajo el ARN total. El resultado de la expresión de *FPN1* en los macrófagos fue el promedio de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones.

Tratamiento de macrófagos con ácido nitrilotriacetato férrico (FENTA)

Con el fin de identificar el efecto del tratamiento con hierro en la expresión del gen *fpn1* en los macrófagos, éstos se incubaron con diferentes concentraciones de ácido nitrilotriacético férrico (FENTA), un donador de hierro a la transferrina. Los macrófagos J774 de ratón (1×10^6 células) se indujeron con 100, 200 y 400 μM FENTA por 6, 9 o 12 horas en medio CRPMI suplementado con 5% de suero bovino fetal.

Para determinar el efecto de MAP en la infección de macrófagos con una sobrecarga de hierro, los macrófagos se infectaron con una MOI 20:1 o se les cultivó con 200 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de proteína cruda de MAP y 400 μM de FENTA (FENTA- MAP).

En todos los tratamientos, el medio se eliminó cuando finalizó la incubación, las células se lavaron una vez con PBS y el ARN total fue extraído y almacenado a -70°C . Los resultados de la expresión del gen *fpn1* de los macrófagos son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones.

Extracción del ARN total

El ARN total de los macrófagos se aisló con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones e instrucciones del fabricante. Todas las muestras se trataron con ADNasa (ADNasa libre de ARNasa) y se purificaron usando el kit RNeasy MinElute™ Clean (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó midiendo la relación de la densidad óptica de 260/280 nm mediante el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc se sintetizó de cuatro unidades (4 U) de enzima transcriptasa reversa Omniscript1 (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La enzima reaccionó en un volumen final de 20 μL , que contenía un buffer de transcriptasa reversa (1 X), dNTP, (0.5 mM cada uno), primers oligo-dT (1 μM), ARN total (1 μg) y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 60 min a 37°C y la enzima se inactivó a 95°C durante 5 min. El volumen final se ajustó a 400 μL con agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *fpn1* de ratón fueron: (sentido 5' GCGTCATTGCTGCTAGAATCG 3', antisentido 5' CATGGAGTTCTGCACACCGTT 3') y como gen de control interno se usó el gen de *gapdh* (sentido 5' ACGGCA-CAGTCAAGGCAGAGAA 3', antisentido 5' TCTCGTCTCTGGAAGATGGTGA 3'). Estos oligonucleótidos se diseñaron utilizando el software Primer Express 2.0. La PCR en

tiempo real se realizó en el termo-analizador génico LightCycler 480 II (Roche, Suiza) y se utilizó el reactivo LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master (Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo a un volumen final de 20 µL, que contenía 10 µL del reactivo tampón 2X SYBR Green I master, los cebadores (S y A, 0.1 µL de cada uno), 5 µL de ADNC diluido y 4.8 µL de agua libre de nucleasas.

Todas las reacciones se colocaron en placas de 96 pocillos ópticos, que primero se incubaron a 95°C durante 10 min seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 s, a 60°C durante 15 s y a 72°C durante 15 s. Los valores de la fluorescencia se colectaron en cada ciclo. Al final de los 45 ciclos, se corrió una extensión final de 5 min a 72°C.

Se analizó la curva de fusión de cada mensajero para demostrar la especificidad y la eficiencia de la amplificación por la PCR se determinó mediante diluciones seriadas de muestras de ADNC. Se corrió un testigo negativo sin ADNC (CST, Control Sin Templado) en cada placa para evaluar la especificidad global; cada muestra se corrió por triplicado. Se determinó el umbral del ciclo (C_t , por sus siglas en inglés) para cada muestra a través de la fase de crecimiento exponencial y la señal de referencia de fluorescencia con respecto al número de ciclos. La muestra se consideró positiva si la fluorescencia superaba el umbral. Las curvas de fusión se transformaron a las primeras derivadas negativas de las curvas de fusión. En el análisis de las curvas de fusión, los primeros picos derivados negativos, característicos de la temperatura de fusión del producto de la PCR, identificaron los productos específicos de la PCR. Las reacciones de amplificación también se comprobaron de manera rutinaria para detectar la presencia de productos no específicos mediante electroforesis en gel de agarosa. Los valores del umbral del ciclo de la muestra se utilizaron para calcular las unidades de expresión relativa (UER) por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Qiagen. Integrative solutions solutions – real-time PCR applications, 2006). Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de Dunnett, usando el programa GraphPad Prism 6.0.7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). La significancia estadística se estableció a $P \leq 0.05$.

Resultados

La infección con MAP de los macrófagos de ratón indujo una expresión diferencial del ARNm de la *FPN1*, que dependió de la multiplicidad de infección

La infección con MAP vivo disminuyó los niveles del ARNm de la *FPN1* de manera dependiente de las MOIs utilizadas en este estudio. En comparación con el grupo testigo, los macrófagos infectados con MOIs de 20:1 y 15:1 no mostraron un cambio significativo en la expresión del gen *fpn1*, mientras que las MOIs de 10:1 y 5:1 indujeron una disminución de 50% y 80%, respectivamente ($P \leq 0.05$, figura 1).

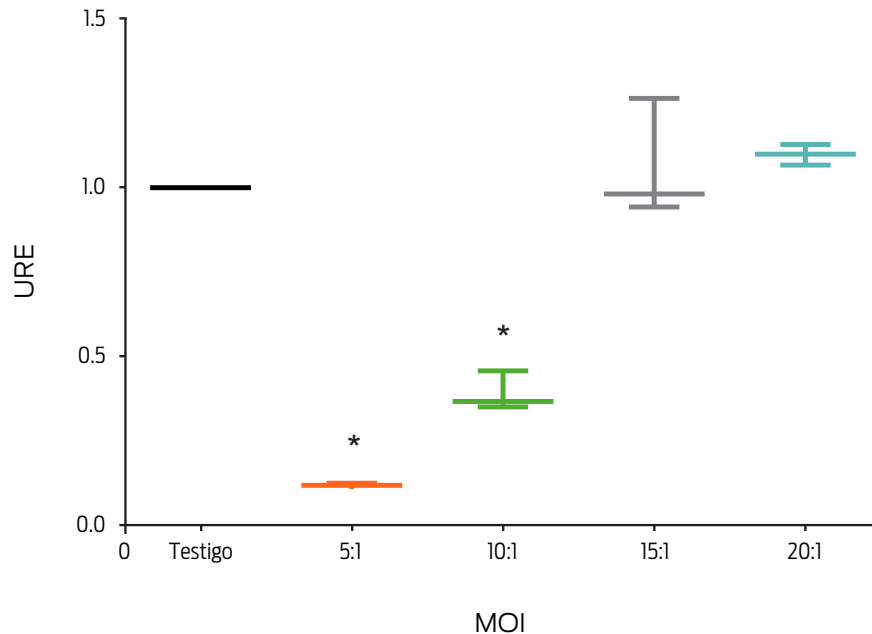


Figura 1. La infección con MAP inhibió la expresión del gen *fpn1* en los macrófagos. Los macrófagos de ratón J774 se infectaron con MAP a diferentes multiplicidades de infección (MOI) durante 6 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadph* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

La estimulación con diferentes concentraciones de extracto de proteína cruda de MAP disminuyó la expresión del ARNm de la FPN1 en macrófagos de ratón

Se analizó el efecto del extracto de la proteína cruda de MAP en la expresión del ARNm de la FPN1 de macrófagos de ratón J774. En este estudio, se decidió utilizar un rango de concentración de proteína que abarcara los límites de la variación experimental reportada en otras investigaciones (Ciaramella *et al.*, 2004; López *et al.*, 2003, 2015; Sánchez *et al.*, 2008). En los macrófagos tratados con 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de extracto crudo de proteína, la expresión del ARNm de la FPN1 disminuyó 25% ($P \leq 0.05$, figura 2).

El tratamiento con diferentes concentraciones de FeNTA indujo la expresión del ARNm de la FPN1 en macrófagos de ratón

La expresión del ARNm de la FPN1 se indujo con una sobrecarga de hierro en macrófagos de ratón J774 en presencia de 100, 200 y 400 μM de FeNTA a las 6, 9 y 12 horas. Los macrófagos tratados con FeNTA mostraron un aumento en la expresión del gen *fpn1* en todos los tiempos estudiados ($P \leq 0.05$, figura 3), que dependió de la concentración de FeNTA. Sin embargo, el tratamiento con 400 μM durante 6 horas indujo el mayor incremento (10 veces más). Por lo tanto, estas condiciones se utilizaron en experimentos posteriores.

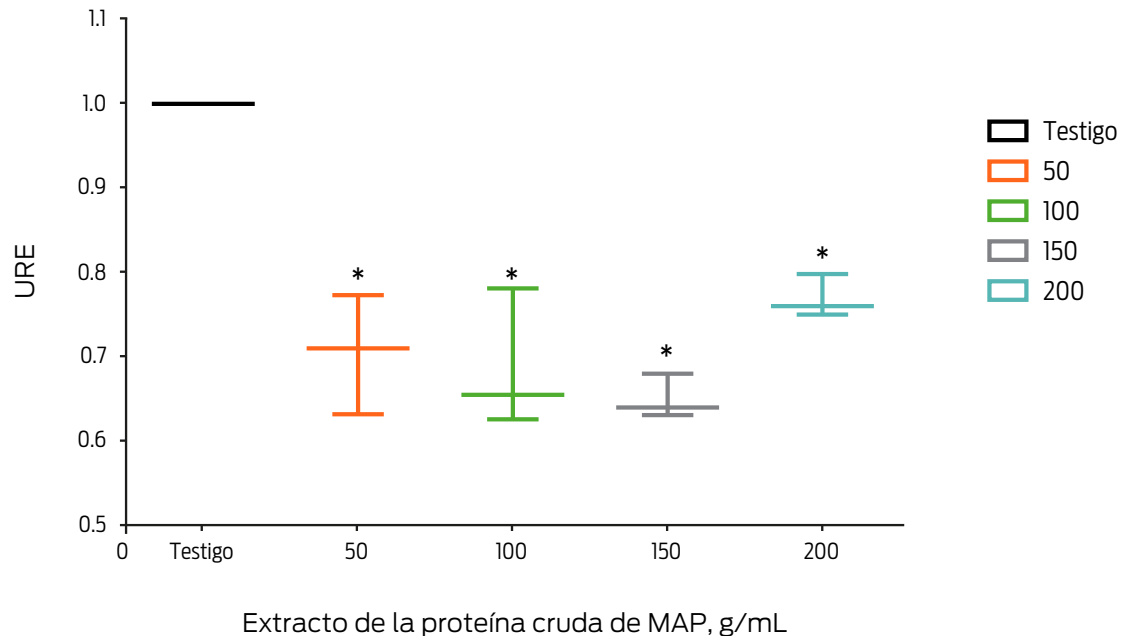


Figura 2. El tratamiento de los macrófagos con el extracto de la proteína cruda de MAP inhibió ligeramente la expresión del gen *fpn1*. Los macrófagos de ratón J774 se incubaron con diferentes concentraciones de extracto de la proteína cruda de MAP durante 6 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadh* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

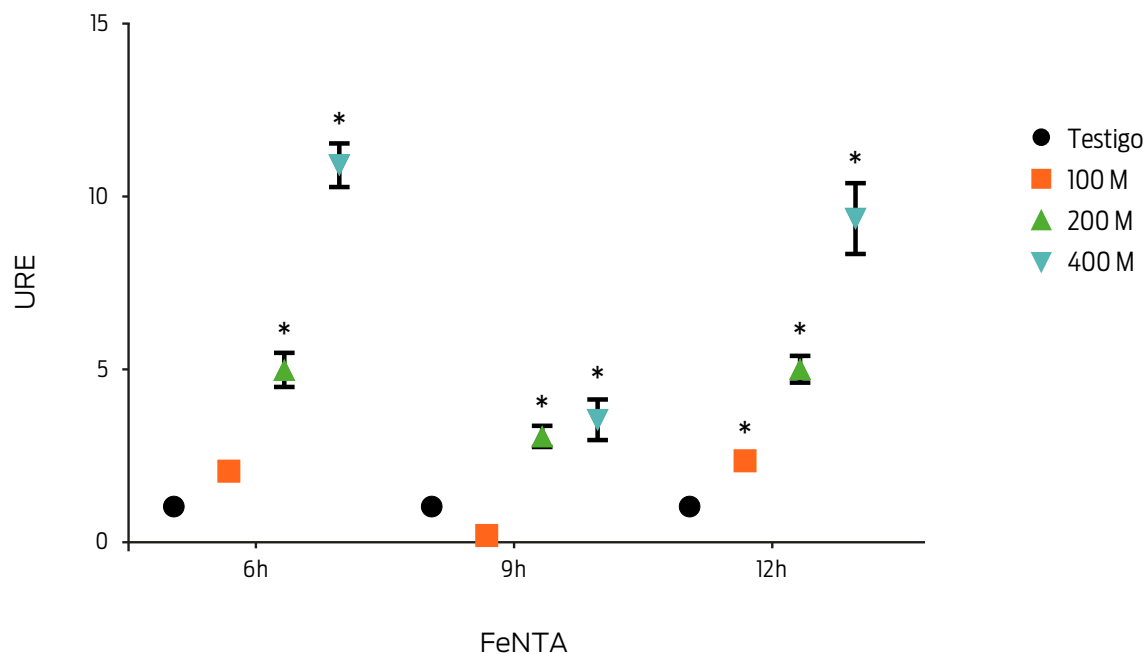


Figura 3. El tratamiento de los macrófagos con FeNTA aumentó la expresión del gen *fpn1* de una manera dependiente de la dosis. Los macrófagos de ratón J774 se incubaron con diferentes concentraciones de FeNTA durante 6, 9 y 12 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadh* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

La infección con MAP inhibió la expresión del ARNm de la *FPN1* en macrófagos de ratón inducidos con una sobrecarga de hierro (FeNTA)

Se midió el efecto de la expresión del ARNm de la *FPN1* en macrófagos infectados con MAP y con sobrecarga de hierro en el medio de cultivo. Los macrófagos incubados con 400 μ M de FENTA e infectados con MAP (FENTA-MAP) mostraron una inhibición de la expresión del ARNm de la *FPN1* de cerca de 70% comparada con la expresión génica en macrófagos no infectados, pero tratados con FeNTA ($P < 0.05$, figura 4).

Discusión

Los tratamientos con MAP vivo y con el extracto de proteína cruda de MAP inhibieron la expresión del ARNm de la *FPN1* en macrófagos de ratón J774. La inhibición fue mayor en el tratamiento con MAP vivo, lo que sugiere que la actividad metabólica de las bacterias juega un papel importante en este proceso. La expresión del ARNm de la *FPN1* dependió de las MOIs utilizadas. En la MOI de 10:1, la expresión del ARNm disminuyó 50%, mientras que en la de 5:1, la disminución fue de 80%. Las MOIs de 20:1 y 15:1 no modificaron la cantidad de ARNm respecto a los macrófagos sin tratamiento. Estos resultados son controvertidos; sin embargo, puede argumentarse que la cantidad de bacterias que infectan a una monocapa de ma-

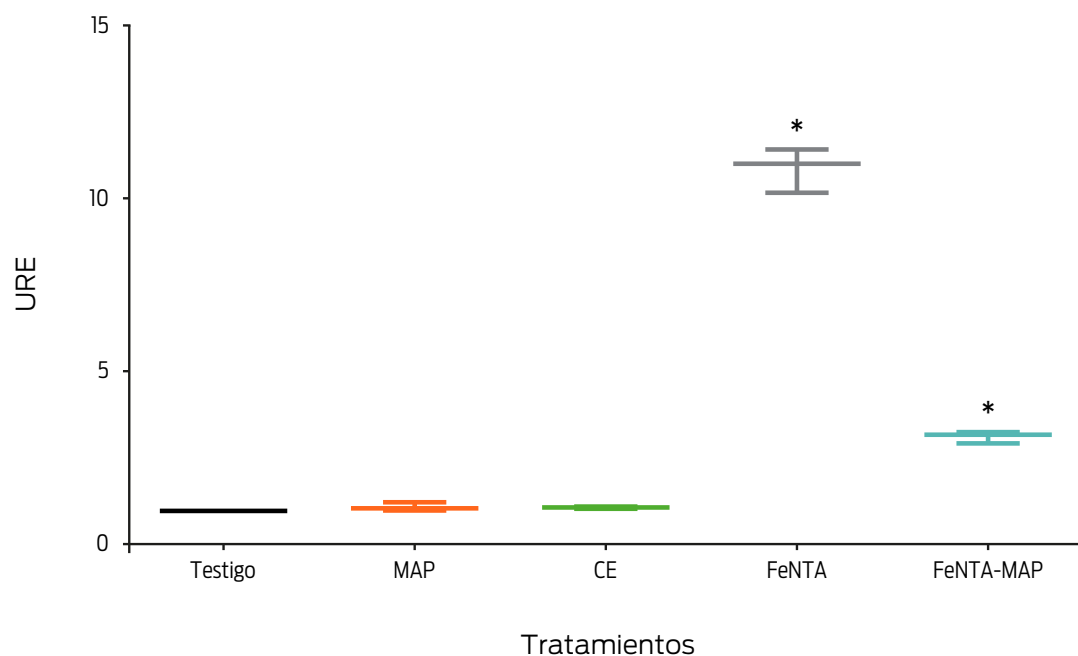


Figura 4. El tratamiento de los macrófagos con FeNTA-MAP disminuyó la expresión del gen *fpn1*. Los macrófagos de ratón J774 se trataron con una multiplicidad de infección (MOI) de 20:1 (MAP), con 200 mg/mL de extracto de proteína cruda de MAP (ECP), con 400mM de FeNTA o con 400 mM de FeNTA y una MOI de 20:1 (FeNTA-MAP) durante 6 horas. Se extrajo el ARN total y la expresión del gen *fpn1* se midió por PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con el gen *gadh* y se expresaron en unidades de expresión relativa (UER). Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Significancia estadística, $P \leq 0.05$.

crófagos puede generar resultados diferentes dependiendo de la multiplicidad de la infección.

La interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de MAP con los receptores de los macrófagos J774 puede estimular diferentes respuestas; sin embargo, bajo una elevada concentración de bacterias, la saturación del receptor de los macrófagos puede detener o cambiar la dirección de estas respuestas. Aún más, un aumento en la estimulación puede activar otras vías de señalización que interfieran con las respuestas que se generen bajo una concentración baja de bacterias. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* induce la apoptosis de los macrófagos con la participación de caspasas cuando se infectan con MOIs $\leq 10:1$, pero cuando los macrófagos se infectan con una MOI de 25:1, se apaga la activación de las caspasas (Lee *et al.* 2006). Por otro lado, los macrófagos infectados con una alta carga bacteriana pueden intentar redirigir la expresión génica para sobrevivir. Es razonable, entonces, proponer que un cambio en las condiciones celulares pueda modificar el escenario de la respuesta de la célula. Los presentes resultados señalan que los macrófagos infectados con una MOI de 20:1 fueron capaces de disminuir la expresión génica de *fpn1* cuando la célula se trató con una sobrecarga de hierro. Este hallazgo evidenció que el decremento en la expresión del ARNm de la FPN1 fue un efecto directo del tratamiento con MAP.

Existe evidencia de que la expresión de génica de *fpn1* se modifica por una infección bacteriana. Por ejemplo, la inhibición de la expresión del ARNm de la FPN1 en monocitos y macrófagos se ha relacionado con la exposición a patógenos Gram negativos y lipopolisacáridos (LPS), como parte de la respuesta inflamatoria aguda, donde también el $\text{IFN}\gamma$ y los receptores Toll-like participan de manera importante en la respuesta (Yang *et al.*, 2002; Ludwiczek *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2006). Por el contrario, los macrófagos 264.7 y AMJ2-C8 activados con $\text{IFN}\gamma$ e infectados con MTB y MA sobreexpresaron el ARNm de la FPN1 (Van Zandt *et al.*, 2008). Sin embargo, en ausencia de $\text{IFN}\gamma$, MTB y *Mycobacterium bovis* BCG inhibieron la expresión génica de *fpn1* de una manera que dependió del tiempo (Li *et al.*, 2013). Estas observaciones en su conjunto sugieren la participación de las bacterias en la regulación de la expresión a nivel transcripcional de la FPN1, que también está regulada por la respuesta inmune, en un intento por favorecer la estancia de las bacterias. Es importante señalar que en los presentes experimentos no se abordó el efecto de MAP en presencia de mediadores inmunes como LPS o $\text{IFN}\gamma$. La influencia de estas moléculas en la expresión del ARNm de la FPN1 en macrófagos de ratón J774 infectados con MAP podría modificar estos hallazgos.

Los patógenos intracelulares compiten con la célula hospedera por el hierro intracelular (Weiss *et al.*, 1994). Desde la perspectiva de los patógenos, una disminución de la FPN1 es benéfica porque mantiene los niveles intracelulares de hierro necesarios para su supervivencia. Sin embargo, desde la perspectiva de la célula huésped, un aumento de la FPN1 contribuye a que el hierro se transporte hacia el exterior de la célula y de esta forma se evita la sobrevivencia de la bacteria (Janagama *et al.*, 2009).

Estos resultados demostraron que la infección con MAP disminuyó la expresión del gen *fpn1* bajo diferentes condiciones, un efecto ya documentado en otras investigaciones con otras especies de micobacterias. En términos de virulencia, ésta podría ser una estrategia para apoyar la supervivencia bacteriana.

Conclusiones

Se demostró que el *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) vivo o su extracto de proteína cruda disminuyeron los niveles del ARNm de la ferroportina 1 (FPN1). Estos hallazgos revelaron un efecto inhibitorio de MAP vivo en la expresión del ARNm de la FPN1 y sugieren que un mecanismo bacteriano de MAP puede cambiar las condiciones de regulación del hierro del huésped para soportar el microambiente hostil de los macrófagos.

Financiamiento

Esta investigación tuvo financiamiento de la Universidad Autónoma de Baja California, a través de la convocatoria interna para el Proyecto No. 201/5/C/20/14.

Conflictos de interés

José A. Gutiérrez Pabello es Secretario General de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los demás autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Bertha Landeros Sánchez diseñó la investigación, realizó los experimentos y escribió el manuscrito.

José A. Gutiérrez Pabello y Efrén Díaz Aparicio lideraron la investigación y el trabajo experimental, proporcionaron reactivos y materiales, analizaron los datos y revisaron y aprobaron el manuscrito para su publicación.

Gerardo E. Medina Basulto and Tomás B. Rentería Evangelista analizaron los datos y revisaron y aprobaron el manuscrito para su publicación.

Sawako Oshima diseñó la investigación, lideró la investigación y el trabajo experimental, proporcionó reactivos y materiales, analizó los datos y revisó y aprobó el manuscrito para su publicación.

Referencias

- 1) Abboud S, Haile DJ. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal Biological Chemistry*, 275:19906-19912.
- 2) Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, Garg SK, Sanarico N, Bocchino M, Galati D, Martino A, Auricchio G, D'Orazio M, Stewart GR, Neyrolles O, Young DB, Colizzi V, Fraziano M. 2004. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 β by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6):1167-1176. doi:10.1086/423850
- 3) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 403:776-781.
- 4) Eckelt E, Jarek M, Frömke C, Meens J and Goethe R. 2014. Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *BMC Genomics*, 15:1076.

- 5) Eckelt E, Meißner T, Meens J, Laarmann K, Nerlich A, Jarek M, Weiss S, Gerlach G and Goethe R. 2015. FurA contributes to the oxidative stress response regulation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 6:16.
- 6) Ganz Tomas. 2009. Iron in innate immunity: Starve the invaders. *Current Opinion in Immunology*, 21:63-67.
- 7) Janagama H, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Rodriguez GM, Smith I, Paustian ML, McGarvey JA, Sreevatsan S. 2009. Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiology*, 155:3683-3690.
- 8) Janagama HK, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Kugadas A, Jagtap P, Higgins LA, Witthuhn BA, Sreevatsan S. 2010. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology*, 10:268-278.
- 9) Krewulak KD, Vogel HJ. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778:1781-1804.
- 10) Lamont E, Wayne Xu, and Srinand S. 2013. Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics*, 14:694.
- 11) Lee J, Remold HG, leong MH, Kornfeld H. 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *Journal of Immunology*. 176:4267-4274.
- 12) Li L, Bannantine J, Zhang Q, Amonsin A, May B, Alt D, Benerji N, Kanjilal S, Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:12344-12349.
- 13) Li W, Liu Y, Dong W, Tuo Q, Liu D, Wu F, Zhang L, Wu J, Zhang W. 2013. Impacts of *Mycobacterium tuberculosis* with different virulence on expressions of ferroportin and ferritin in infected macrophages. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 29(7):710-713.
- 14) López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *Journal of Immunology*, 170(5):2409-2416.
- 15) López-Rincón G, Mancilla R, Pereira-Suárez AL, Martínez-Neri PA, Ochoa-Zarzosa A, Muñoz-Valle JF, Estrada-Chávez C. 2015. Expression of autocrine prolactin and the short isoform of prolactin receptor are associated with inflammatory response and apoptosis in monocytes stimulated with *Mycobacterium bovis* proteins. *Experimental and Molecular Pathology*, 98:517-526.
- 16) Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. 2003. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 101:4148-4154.
- 17) McKie A, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters T, Farzaneh F, Hediger M, Hentze M, Simpson R. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, 5:299-309.
- 18) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306:2090-2093.

- 19) Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson R, Nizet V. 2006. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, 107:3727-3732.
- 20) Qiagen. PCR Protocols & Applications [en línea]. <https://www.qiagen.com/mx/resources/molecular-biology-methods/pcr/#Real-time> [consulta: 03 mar 2015].
- 21) Sánchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69:20-28.
- 22) Van Zandt K, Sow F, Florence W, Zwilling B, Satoskar A, Schlesinger L, Lafuse W. 2008. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. *Journal of Leukocyte Biology*, 84:689-700.
- 23) Weiss G, Werner F, Werner E, Grunewald K, Wachter H, Hentze M. 1994. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *Journal of Experimental Medicine*, 180:969-976.
- 24) Weiss G. 2009. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:682-693.
- 25) Yang F, Liu X, Quinones M, Melby P, Ghio A, Haile D. 2002. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 277:39786-39791.
- 26) Zhu X, Tu ZJ, Coussens PM, Kapur V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes and Infection*, 10:1274-1282.

Bertha Landeros Sánchez*¹

0000-0002-1293-2759

José A. Gutiérrez Pabello²

0000-0001-5801-5887

Gerardo E. Medina Basulto³

0000-0001-8338-8829

Tomás B. Rentería Evangelista⁴

0000-0002-1165-0055

Efrén Díaz Aparicio⁵

0000-0002-1669-1323

Sawako Oshima³

0000-0003-2302-8201

¹Laboratorio de Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Universidad Autónoma de Baja California
Calle Universidad 14418, Parque Industrial
Internacional Tijuana
22390, Tijuana, Baja California, México

²Departamento de Inmunología y Microbiología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, 04510
Ciudad de México, México

³Laboratorio de Biología Molecular

⁴Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias
Universidad Autónoma de Baja California
km. 3.5 Carretera San Felipe
Fraccionamiento Campestre
Mexicali, Baja California, 21386, México

⁵Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534
Col. Progreso, 62550, Jiutepec, Morelos, México

***Corresponding author:**

Tel: +52 664-265-4845

Email address:

bertha.landeros@uabc.edu.mx

Received: 2015-07-16

Accepted: 2016-03-16

Published: 2016-03-31

Additional information and declarations
can be found on page 9

© Copyright 2016
Bertha Landeros Sánchez *et al.*



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* down-regulates mRNA expression of iron-induced macrophage Ferroportin 1

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of Johne's disease. The mechanisms by which MAP is able to adapt to the innate host response are still unclear. We examined Ferroportin 1 (FPN1) mRNA expression levels via real-time PCR of the mouse macrophage cell line J774 that was incubated in the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) or MAP crude protein extract. Infection with live MAP decreased FPN1 mRNA levels in a multiplicity of infection (MOI)-dependent fashion. Macrophages infected with MOIs of 20:1 and 15:1 did not show any change in FPN1 gene expression, whereas MOIs of 10:1 and 5:1 induced a decrease of 50 and 80%, respectively. Macrophages treated with 50, 100, 150 and 200 µg/mL of MAP crude extract (ATCC19698) decreased FPN1 mRNA expression by 25%. Additionally, up-regulation of FPN1 mRNA by an iron overload treatment of 400 µM of ferric nitrilotriacetate (FeNTA) was abrogated by live MAP (MOI 20:1) by approximately 70%. Our data revealed an inhibitory effect of MAP on FPN1 mRNA and suggested a bacterial mechanism that may play a role in host iron regulation.

Keywords: Gene expression; Johne's disease; Ferroportin 1; Iron; Macrophages.

Introduction

Paratuberculosis (PTB) is an infectious disease characterized by diarrhea and granulomatous enterocolitis in domestic and wild ruminants. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent of PTB. This pathogen is capable of infecting enteric macrophages and lives intracellularly. In order for bacteria to invade and multiply within host cells, the cells must meet specific metabolic requirements. A key element among them is iron, a cofactor of many cellular proteins that participates in electron transport, ROS detoxification and DNA synthesis (Eckelt *et al.*, 2014, 2015). Iron is not freely available; therefore, bacteria utilize various iron uptake mechanisms to acquire it. Production of siderophores, hemophores and cell surface receptors that catch hemoproteins helps bacteria to circumvent this problem (Krewulak and Vogel, 2008). In mycobacteria, mycobactin is a siderophore responsible for the binding of iron and its transport into cells. Mycobactin is

encoded by a gene cluster designated *mbtA-J*; in MAP, *mbtA* is shorter and encodes a truncated version of the protein that initiates mycobactin synthesis. Truncation of *mbtA* may explain why MAP is not able to produce mycobactin in a laboratory culture (Li *et al.*, 2005). Despite the *in vitro* requirement for mycobactin, MAP overexpresses the genes involved in mycobactin synthesis in bovine macrophages (Zhu *et al.*, 2008). In the presence of iron, the MAP transcriptional regulator IdeR recognizes consensus sequences in “iron boxes” of promoter sequences and regulates the expression of genes involved in iron acquisition (*mbt*) and storage (*bfrA*) (Janagama *et al.*, 2009, 2010). The interactome of another iron acquisition mechanism dependent on the presence of nitric oxide has been recently characterized in MAP (Lamont *et al.*, 2013).

The regulation of iron homeostasis in macrophages involves numerous proteins (Weiss, 2009). Macrophages can acquire iron through transferrin receptor 1 (Tfr1) and the transferrin-mediated capture of iron. Molecular iron can be obtained through transporter 1 (Dmt1) or by phagocytosis of old erythrocytes. Iron is then transported, reused and stored in macrophages through the interaction of iron regulatory elements (IREs) with iron regulatory proteins (IRPs). Ferroportin 1 (FPN1) is an iron export protein that is present on the surface of macrophages, hepatocytes, enterocytes, and erythrocytes. Ferroportin 1 is specific for the ferrous form of iron (Fe²⁺) (Abboud and Haile, 2000; Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000). Iron efflux is controlled in macrophages by hepcidin, which interacts with FPN1. This interaction results in FPN1 internalization and degradation by proteasomes, which blocks iron efflux in macrophages (Nemeth *et al.*, 2004). Accumulation of iron inside the cell promotes the development of intracellular pathogens and decreases the secretion of IL-6 (Ganz, 2009). Macrophage FPN1 mRNA expression is increased by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and *Mycobacterium avium* (MA) infection. However, an even higher level of increase of *fpn1* gene expression in MTB- and MA-infected macrophages was achieved when macrophages were classically activated by interferon gamma (IFN γ) (Van Zandt *et al.*, 2008). The effect of MAP on FPN1 mRNA expression is not well understood.

Considering the roles and relevance of FPN1 and iron in macrophages during MAP infection, we hypothesized that a high concentration of iron is necessary for the survival of mycobacteria in macrophages during the process of infection. Consequently, the FPN1 mRNA concentration should be decreased to facilitate the establishment of infection. In this study, we aimed to examine FPN1 mRNA expression levels via real-time polymerase chain reaction (PCR) in the mouse macrophage cell line J774 that was incubated in the presence of live MAP, with or without an iron overload treatment, and MAP crude protein extract. Our results identified the down-regulation of macrophage FPN1 mRNA expression as a direct effect of MAP infection.

Materials and methods

Bacterial cultures and crude protein extract

MAP (ATCC 19698) was cultivated in Middlebrook 7H9 medium supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC) (Difco, Detroit, MI, USA) and mycobactin (Allied Monitor Inc., USA)(4 mg/L) for 4 weeks. Bacteria were stored at

-70°C in 1-mL aliquots with 4×10^8 colony forming units (CFU)/mL in RPMI 1640 medium (Difco, Detroit, MI, USA) containing L-glutamine, amino acids, sodium pyruvate and sodium bicarbonate (complete RPMI [CRPMI]) with 10% glycerol. The number of bacteria was confirmed by diluting the samples and plating them on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC and mycobactin. Mycobacterial crude protein extracts were prepared from 50 mL of culture after 1 month of growth. The bacterial suspension was centrifuged for 20 min at 3,000 X g; the pellet was washed with PBS and resuspended in CRPMI. The suspension was disrupted in a bread beater in a proportion of 1 g/mL for 5 min and centrifuged for 20 min at 3,000 X g to eliminate cellular debris. The supernatant was filtered through a 0.22 μ m membrane. The protein concentration of the filtered extract was determined by the Bradford method. Aliquots of crude protein extract were kept at -70°C until further use.

Cell culture of J774 murine macrophages

The murine macrophage cell line J774 was propagated in CRPMI enriched with 5% heat-inactivated fetal bovine serum without antibiotics. Cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂. Macrophages were quantified in a Neubauer chamber after dilution with trypan blue. Six-well culture plates were then seeded with 1×10^6 cells per well, and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 4 hours to allow adhesion to the surface. Non-adherent cells were removed by washing with CRPMI supplemented with 5% fetal bovine serum. Adherent macrophages were then used for subsequent experiments.

Macrophage treatment with live MAP and crude protein extract

In an attempt to identify the effect of live MAP and crude protein extract on macrophage *fpn1* gene expression, macrophage monolayers containing 1×10^6 cells in tissue culture plates were infected with either live MAP cells or treated with MAP crude protein extract. For the infection, 4 different multiplicities of infection (MOIs 5:1, 10:1, 15:1 and 20:1) were added to the wells, and then the plates were centrifuged at 200 X g for 10 min and incubated at 37°C for 6 hours. For the protein treatment, wells were incubated with 50, 100, 150 or 200 μ g/mL of MAP crude protein extract for 6 hours. At the end of the incubation, culture medium was removed from all treatments, cells were washed once with PBS, and total RNA was extracted. Macrophage *fpn1* gene expression results are the average of 3 independent experiments each one with 3 replicates.

Macrophage treatment with ferric nitrilotriacetate (FeNTA)

To identify the effect of an iron overload treatment on macrophage *fpn1* gene expression, macrophages were incubated with different concentrations of ferric nitrilotriacetate (FeNTA), a transferrin iron donor. J774 murine macrophages (1×10^6 cells) were treated with 100, 200 and 400 μ M FeNTA for 6, 9 or 12 hours in CRPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum. In an attempt to determine the effect of MAP infection in macrophages with an iron overload, macrophages were either MAP-infected (MOI 20:1), treated with 200 μ g/mL of MAP

crude protein extract, treated with 400 μ M FeNTA, or MAP-infected (MOI 20:1) in the presence of 400 μ M FeNTA (FeNTA-MAP). For all treatments, the medium was removed at the end of the incubation time, cells were washed once with PBS, and total RNA was extracted and stored at -70°C . Macrophage *fpn1* gene expression results were obtained from 3 independent experiments with 3 replicates each.

RNA extraction

Macrophage total RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommendations and instructions. All samples were treated with DNase (RNase-Free DNase Set) and purified using columns from the RNeasy MinEluteTM Clean kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by 1% agarose gel electrophoresis, while quantification was determined by measuring the 260/280 nm optical density ratio using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

cDNA synthesis

Following the manufacturer's instructions, cDNA was synthesized using 4 U of the reverse transcriptase enzyme Omniscript1 (Qiagen, Hilden, Germany) in a final volume of 20 μ L containing an RT buffer (1x), dNTPs (0.5 mM each one), oligo-dT primers (1 μ M), total RNA template (1 μ g) and nuclease-free water. The mixture was incubated for 60 min at 37°C , and the enzyme was inactivated at 95°C for 5 min. The final volume was adjusted to 400 μ L with nuclease-free water and stored at -80°C until use.

Real-time PCR

Primers specific for *fpn1* gene (Forward 5' GCGTCATTGCTGCTAGAATCG 3', Reverse 5' CATGGAGTTCTGCACACCGTT 3') and for the housekeeping *gapdh* gene (Forward 5' ACGGCACAGTCAAGGCAGAGAA 3', Reverse 5' TCTCGCTCCTGGAAGATGGTGA 3'), which was used as an internal control, were designed using the Primer express 2.0 software. Real-time PCR was performed using a Roche LightCycler[®] 480 II (Roche, Indianapolis, IN, USA) and a Roche LightCycler[®] 480 DNA SYBR Green I Master reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). Amplification reactions were performed in a final volume of 20 μ L containing 10 μ L of 2X SYBR Green I master reagent buffer, primers (F and R, 0.1 μ L each), 5 μ L of diluted cDNA and 4.8 μ L of nuclease free water. All reactions were run in 96-well optical plates with an initial incubation of 95°C for 10 min, and then 45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 15 s and 72°C for 15 s during which the fluorescence data were collected. At the end of the 45 cycles, a final extension was run for 5 min at 72°C . For each target, a melting curve analysis was performed to demonstrate specificity, and the efficiency of the PCR amplification was determined by assaying the amplification of serially diluted cDNA samples. A negative control without cDNA (NTC, No Template Control) was run in each plate to assess the overall specificity; each sample was set up in triplicate. A threshold cycle (Ct) was determined for each sample by examining exponential growth phase and the baseline signal from fluorescence versus cycle number plots. A sample was deemed positive if fluorescence exceeded the threshold. Melting curves were

transformed to negative first derivative melting curves. In the melting curve analysis, the negative first derivative peaks, which are characteristic of the PCR product melting temperature, were used to identify specific PCR products. Amplification reactions were also routinely checked for the presence of nonspecific products by agarose gel electrophoresis. Threshold cycle values of the sample were used to calculate the units of relative expression (URE) by the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Qiagen integrative solutions – real-time PCR applications, 2006). The results were obtained from 3 independent experiments with 3 replicates each.

Statistical analyses

Results were analyzed by one-way ANOVA, followed by Dunnett's test, using GraphPad Prism 6.0.7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

MAP infection of murine macrophages induced differential FPN1 mRNA expression dependent on the multiplicity of infection.

Different MOIs of MAP were used in this experiment to determine a MAP dose-response in J774 murine macrophages. Infection with live MAP decreased FPN1 mRNA levels in an MOI dependent fashion. In comparison with the control group, macrophages infected with MOIs of 20:1 and 15:1 did not show a significant change in *fpn1* gene expression, whereas MOIs of 10:1 and 5:1 induced a decrease of 50 and 80%, respectively ($P \leq 0.05$, Fig. 1).

Stimulation with different concentrations of MAP crude protein extract decreased the FPN1 mRNA expression in murine macrophages.

The effect of MAP crude protein extract on FPN1 mRNA expression was analyzed. In this study, we decided to use a protein concentration range that covered the limits of the experimental variation previously reported (Ciaramella *et al.*, 2004; López *et al.*, 2003, 2015; Sanchez *et al.*, 2008). Macrophages treated with 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/mL}$ of MAP crude extract decreased FPN1 mRNA expression by 25% ($P \leq 0.05$, Fig. 2).

Treatment with different concentrations of FeNTA induced FPN1 mRNA expression in murine macrophages.

Induction of FPN1 mRNA expression by iron overload was measured in the presence of 100, 200 and 400 μM of the transferrin iron donor FeNTA for 6, 9 and 12 hours. Macrophages treated with FeNTA showed an increase in *fpn1* gene expression at all of the analyzed time points ($P \leq 0.05$, Fig. 3). The increase in gene expression was FeNTA concentration-dependent. However, the treatment using 400 μM at 6 hours induced the highest increase (10-fold). Therefore, these conditions were used in subsequent experiments.

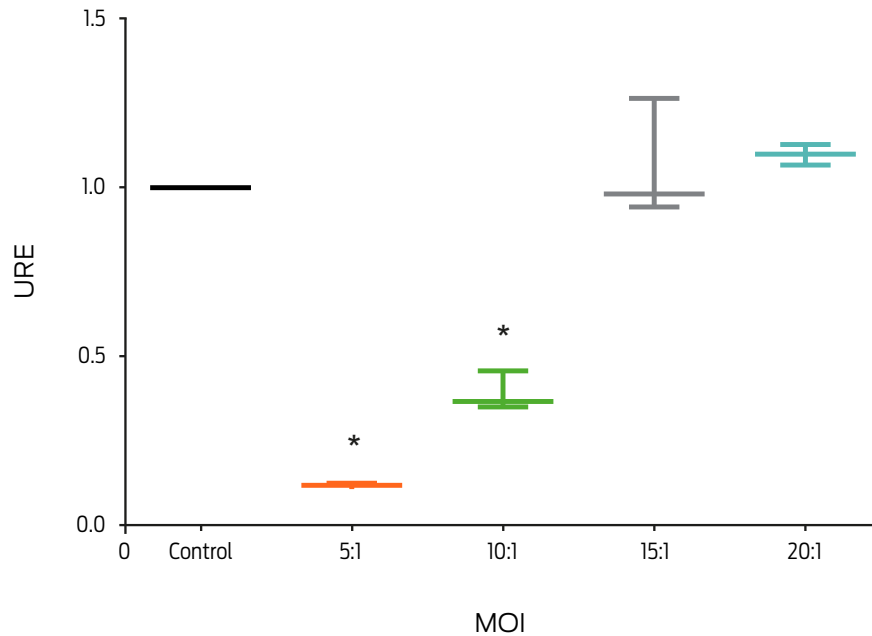


Figure 1. Infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) down-regulates macrophage *fcn1* gene expression. Murine macrophages, J774, were infected with MAP at different multiplicities of infection (MOIs) for 6 hours. Total RNA was extracted and gene expression was measured by real-time PCR. Results were normalized to GAPDH and expressed as units of relative expression (URE). Results are the mean $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 3 replicates each. Statistical significance, $P \leq 0.05$.

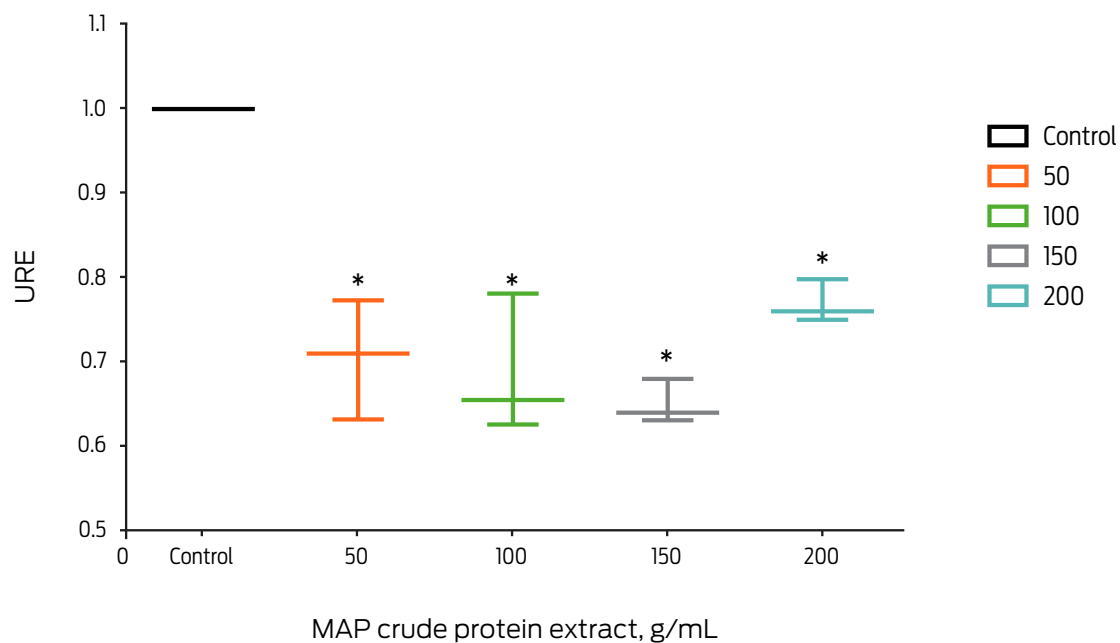


Figure 2. Macrophage treatment with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) crude protein extract slightly down-regulates *fcn1* gene expression. Murine macrophages, J774, were incubated with different concentrations of MAP crude protein extract for 6 hours. Total RNA was extracted and gene expression was measured by real-time PCR. Results were normalized to GAPDH and expressed as units of relative expression (URE). Results are the mean $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 3 replicates each. Statistical significance, $P \leq 0.05$.

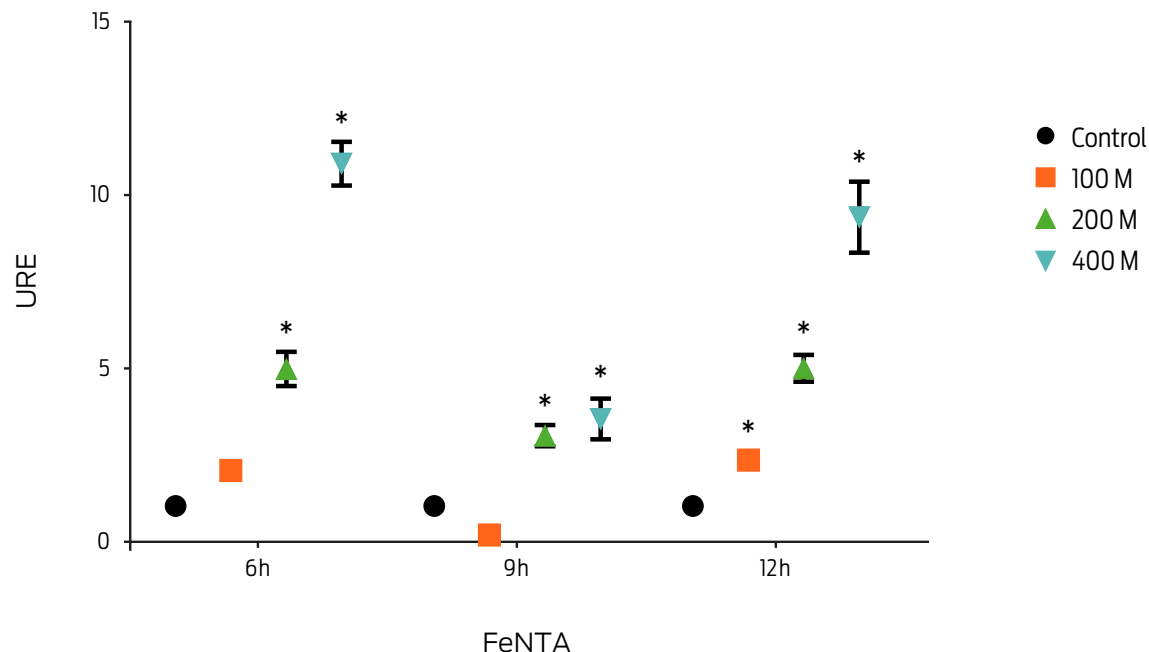


Figure 3. Macrophage treatment with ferric nitrilotriacetate (FeNTA) increases *fpn1* gene expression in a dose dependent manner. Murine macrophages, J774, were incubated with different concentrations of FeNTA for 6, 9 and 12 hours. Total RNA was extracted and gene expression was measured by real-time PCR. Results were normalized to GAPDH and expressed as units of relative expression (URE). Results are the mean $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 3 replicates each. Statistical significance, $P \leq 0.05$.

FPN1 mRNA expression induced by iron overload (FeNTA) is down-regulated by MAP infection in J774 murine macrophages

The effect of MAP infection on FPN1 mRNA expression in macrophages with an iron overload was measured. MAP-infected macrophages incubated with 400 μ M FeNTA (FeNTA-MAP) exhibited a 70% down-regulation of *fpn1* gene expression compared to the gene expression in uninfected, FeNTA-treated macrophages ($P < 0.05$, Fig. 4).

Discussion

Ferroportin 1 mRNA expression in J774 mouse macrophages was down-regulated following treatment with live MAP or its crude protein extract. Down-regulation induced by viable bacteria was greater, suggesting that the metabolic activity of the bacteria played a role in the process. Differential *fpn1* gene expression was MOI-dependent. MOIs of 10:1 and 5:1 induced a decrease of 50 and 80%, respectively, whereas 20:1 and 15:1 did not modify the mRNA levels. Our results are controversial; however, we may argue that the amount of bacteria infecting a macrophage monolayer may generate different results depending on the multiplicity of infection. The interaction of bacterial PAMPs with macrophage receptors can stimulate a variety of responses; however, under a high concentration of bacteria, saturation of the receptor may stop or change the direction of these responses. Furthermore, an increase in stimulation may activate other signaling pathways that interfere with responses elicited under a low bacterial concentration. For instance,

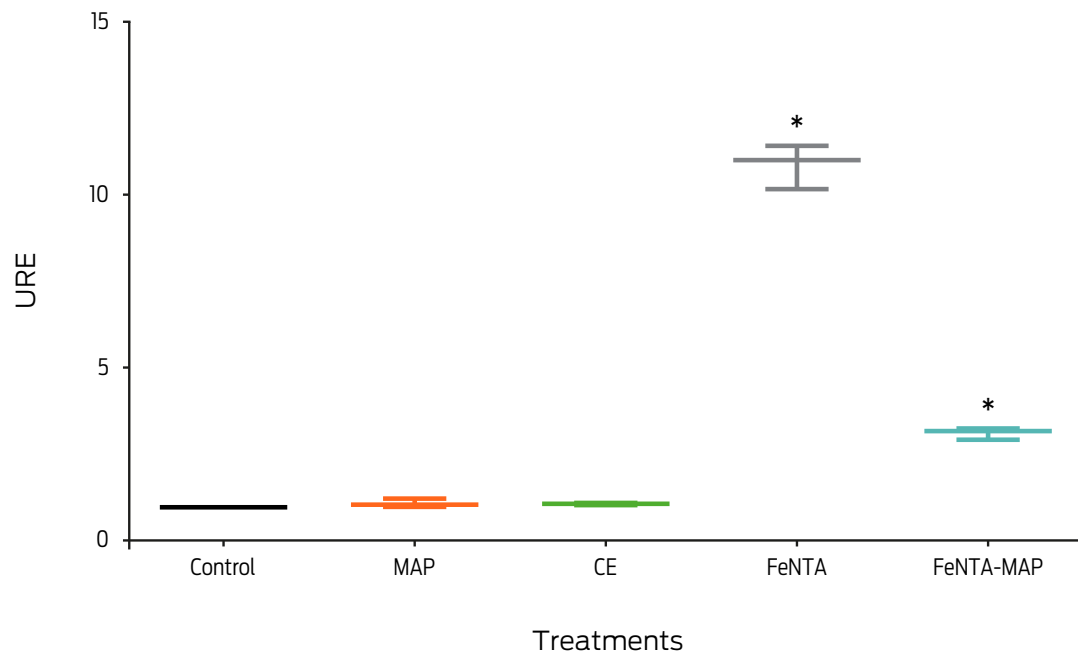


Figure 4. Macrophage treatment with ferric nitrilotriacetate and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (FeNTA-MAP) decreases *fpn1* gene expression. Murine macrophages, J774, were treated with 400 μ M of FeNTA, 200 mg/mL of crude extract (CE), a MOI of 20:1 MAP or with 400 μ M of FeNTA and a MOI of 20:1 MAP (FeNTA-MAP) for 6 hours. Total RNA was extracted and gene expression was measured by real-time PCR. Results were normalized to GAPDH and expressed as units of relative expression (URE). Results are the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments with three replicates each. Statistical significance, $P \leq 0.05$.

Mycobacterium tuberculosis induces macrophage apoptosis with the participation of caspases when MOIs $\leq 10:1$ are applied, but caspase activation is turned off at an MOI of 25:1 (Lee *et al.*, 2006). On the other hand, macrophages infected with a high bacterial burden may try to redirect gene expression in an attempt to survive. It is reasonable then to propose that a shift in cellular conditions may modify the cell response scenario. Our results note that macrophages infected with an MOI of 20:1 were able to decrease *fpn1* gene expression when the cell suffered an iron overload. This result further supports our experimental evidence, which shows a decrease in FPN1 mRNA levels as a direct effect of MAP.

There is evidence that *fpn1* gene expression is modified by bacterial infection. For instance, down-regulation of FPN1 mRNA expression in monocytes and macrophages has been linked to exposure to Gram-negative pathogens and LPS, as part of the acute inflammatory response where IFN γ and Toll-like receptors are also key players (Yang *et al.*, 2002; Ludwiczek *et al.*, 2003; Peyssonnaud *et al.*, 2006). In contrast, MTB and MA up-regulated FPN1 mRNA levels in the mouse macrophage cell lines RAW264.7 and AMJ2-C8 under IFN γ activation (Van Zandt *et al.*, 2008). However, in the absence of IFN γ , MTB and *Mycobacterium bovis* BCG down-regulated *fpn1* gene expression in a time dependent manner (Li *et al.*, 2013). All together, these observations suggest a role for bacteria in the transcriptional regulation of FPN1, which is also being regulated by the immune response in an attempt to push the balance in favor of the host. It is important to note that our experiments did not address the effect of MAP in the presence of immune

mediators such as LPS or IFN γ . The influence of these molecules on FPN1 mRNA expression in MAP-infected macrophages may modify our findings.

Host cells and pathogens compete for intracellular iron (Weiss *et al.*, 1994). From the pathogen's point of view, a decrease in FPN1 is beneficial, maintaining the intracellular iron levels necessary for bacterial survival; however, from the host's point of view, an increase of FPN1 allows the iron to be transported away from intracellular bacteria (Janagama *et al.*, 2009). Our results demonstrated that MAP infection decreases *fpn1* gene expression under several different conditions. This observation indicates that MAP induces an effect that has been previously documented with other species of mycobacteria. In terms of virulence, this could be a strategy to support bacterial survival.

Conclusions

We demonstrated that live MAP or its crude protein extract decreased FPN1 mRNA levels. Our data revealed an inhibitory effect of live MAP on FPN1 mRNA and suggested a bacterial mechanism that may play a role in host iron regulation, thus helping bacteria to endure the hostile macrophage microenvironment.

Funding

The Convocatoria Interna UABC (Project No. 201/5/C/20/14) supported this work.

Conflicts of interest

José A. Gutiérrez Pabello is Secretary General at Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. The rest of the authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions

Bertha Landeros Sánchez designed the research, conducted the experiments, and wrote the manuscript.

José A. Gutiérrez Pabello and Efrén Díaz Aparicio led the research and experimental work, provided reagents and materials, analyzed the data, and revised and approved the manuscript for publication.

Gerardo E. Medina Basulto and Tomás B. Rentería Evangelista analyzed the data and revised and approved the manuscript for publication.

Sawako Oshima designed the research, led the research and experimental work, provided reagents and materials, analyzed the data, and revised and approved the manuscript for publication.

References

- 1) Abboud S, Haile DJ. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal Biological Chemistry*, 275:19906-19912.
- 2) Ciaramella A, Cavone A, Santucci MB, Garg SK, Sanarico N, Bocchino M, Galati D, Martino A, Auricchio G, D'Orazio M, Stewart GR, Neyrolles O, Young DB, Colizzi V, Fraziano M. 2004. Induction of apoptosis and release of interleukin-1 β by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of mycobacterial infection. *Journal of Infectious Diseases*, 190(6):1167-1176. doi:10.1086/423850
- 3) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 403:776-781.
- 4) Eckelt E, Jarek M, Frömke C, Meens J and Goethe R. 2014. Identification of a lineage specific zinc responsive genomic island in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *BMC Genomics*, 15:1076.
- 5) Eckelt E, Meißner T, Meens J, Laarmann K, Nerlich A, Jarek M, Weiss S, Gerlach G and Goethe R. 2015. FurA contributes to the oxidative stress response regulation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 6:16.
- 6) Ganz Tomas. 2009. Iron in innate immunity: Starve the invaders. *Current Opinion in Immunology*, 21:63-67.
- 7) Janagama H, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Rodriguez GM, Smith I, Paustian ML, McGarvey JA, Sreevatsan S. 2009. Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiology*, 155:3683-3690.
- 8) Janagama HK, Senthilkumar TM, Bannantine JP, Kugadas A, Jagtap P, Higgins LA, Witthuhn BA, Sreevatsan S. 2010. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology*, 10:268-278.
- 9) Krewulak KD, Vogel HJ. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778:1781-1804.
- 10) Lamont E, Wayne Xu, and Srinand S. 2013. Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics*, 14:694.
- 11) Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *Journal of Immunology*, 176:4267-4274.
- 12) Li L, Bannantine J, Zhang Q, Amonsin A, May B, Alt D, Benerji N, Kanjilal S, Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:12344-12349.
- 13) Li W, Liu Y, Dong W, Tuo Q, Liu D, Wu F, Zhang L, Wu J, Zhang W. 2013. Impacts of *Mycobacterium tuberculosis* with different virulence on expressions of ferroportin and ferritin in infected macrophages. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 29(7):710-713.

- 14) López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *Journal of Immunology*, 170(5):2409-2416.
- 15) López-Rincón G, Mancilla R, Pereira-Suárez AL, Martínez-Neri PA, Ochoa-Zarzosa A, Muñoz-Valle JF, Estrada-Chávez C. 2015. Expression of autocrine prolactin and the short isoform of prolactin receptor are associated with inflammatory response and apoptosis in monocytes stimulated with *Mycobacterium bovis* proteins. *Experimental and Molecular Pathology*, 98:517-526.
- 16) Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. 2003. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 101:4148-4154.
- 17) McKie A, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters T, Farzaneh F, Hediger M, Hentze M, Simpson R. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*, 5:299-309.
- 18) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306:2090-2093.
- 19) Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson R, Nizet V. 2006. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, 107:3727-3732.
- 20) Qiagen. PCR Protocols & Applications [on line]. <https://www.qiagen.com/mx/resources/molecular-biology-methods/pcr/#Real-time> [access: mar 3, 2015].
- 21) Sánchez A, Espinosa P, Esparza MA, Colon M, Bernal G, Mancilla R. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69:20-28.
- 22) Van Zandt K, Sow F, Florence W, Zwilling B, Satoskar A, Schlesinger L, Lafuse W. 2008. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. *Journal of Leukocyte Biology*, 84:689-700.
- 23) Weiss G, Werner F, Werner E, Grunewald K, Wachter H, Hentze M. 1994. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *Journal of Experimental Medicine*, 180:969-976.
- 24) Weiss G. 2009. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790:682-693.
- 25) Yang F, Liu X, Quinones M, Melby P, Ghio A, Haile D. 2002. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 277:39786-39791.
- 26) Zhu X, Tu ZJ, Coussens PM, Kapur V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes and Infection*, 10:1274-1282.