



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización de una nueva familia de proteínas transportadoras de colesterol”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Kevin Manuel Méndez Acevedo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis A. Vaca Domínguez
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Antonio Peña Díaz
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Luis Padilla Noriega
Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D. F. Noviembre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicado a:

*Todas las personas que han estado presentes en mi vida,
en especial para quienes lo saben.*

*“El comienzo de un nuevo día es la última oportunidad para alcanzar todo lo que anhelas.”
KMMA*

A mis padres Liliana e Isaac. Gracias por todo.

A mis Abuelos: Araceli, Zuly y Leonardo.

A mi familia.

A mis amigos, especialmente a Andrea, Arlette y Vicente.

Agradecimientos

Al Doctor Luis Vaca por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y poder llevar a cabo el presente trabajo, muchas gracias.

Al Dr. Antonio Peña y al Dr. Luis Padilla por haber sido parte de mi comité tutorial.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios:

Dra. Clorinda Arias Álvarez, Dra. María Soledad Funes Argüello, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. Jaime Mas Oliva y Dr. Diego González Halphen.

A los miembros del laboratorio 126 Norte.

Al Instituto de Fisiología Celular.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por la beca otorgada por el CONACyT con el número de apoyo 333665.

Resumen

El colesterol es un compuesto esencial para las células de los mamíferos ya que está involucrado en diversas funciones de la célula, como conferir cierta organización a la membrana plasmática, formando parte de dominios específicos de la membrana conocidos como balsas lipídicas. Así mismo, el colesterol es un compuesto clave como precursor de moléculas de gran importancia como: las hormonas esteroideas, sales biliares y la vitamina D. El transporte de colesterol a través de la circulación y la absorción en los tejidos es un proceso bien conocido en la actualidad. Sin embargo, se conoce mucho menos sobre los mecanismos de internalización del colesterol y del transporte intracelular del colesterol.

Recientemente en el laboratorio se identificó una proteína involucrada en la internalización de colesterol en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Un análisis bioinformático nos permitió identificar a dos proteínas presentes en diversos tejidos de mamíferos, como posibles ortólogos de la proteína de *C. elegans*. Las proteínas SIDT1 y SDIT2, las cuales dado su porcentaje de identidad y dominios conservados de reconocimiento de colesterol (dominios CRAC) predichos, pudieran estar involucrados en el transporte intracelular de colesterol en células de mamíferos.

Con el fin de determinar si estas proteínas de mamíferos pudieran jugar algún papel en el transporte intracelular de colesterol, en este trabajo se determinó la interacción directa entre SIDT1 y SIDT2 con colesterol, mediante la técnica de FRET. Únicamente se obtuvieron datos que aportan información para la proteína SDIT1 humana en la cual, se pudo establecer la funcionalidad de un dominio CRAC conservado y se identificó una secuencia señal de relocalización de la proteína, la cual responde a modificaciones en la concentración de colesterol en la membrana plasmática, estos datos se obtuvieron mediante ensayos de mutagénesis dirigida y microscopía. En cuanto a la proteína SIDT2 no fue posible obtener algún tipo de información que nos sugiriera el papel que desempeña dentro de la célula.

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren a que SDIT1 es parte de una nueva familia de proteínas involucradas en el transporte de colesterol en células de mamífero.

Índice

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
ÍNDICE	7
FIGURAS	9
TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL COLESTEROL	12
TRANSPORTE DE COLESTEROL SISTÉMICO, A TRAVÉS DE LA CIRCULACIÓN.....	14
TRANSPORTE DE COLESTEROL EN LAS CÉLULAS	16
<i>INTERNALIZACIÓN DE COLESTEROL</i>	16
<i>TRANSPORTE INTRACELULAR DE COLESTEROL</i>	20
SECUENCIAS PROTEICAS DE RECONOCIMIENTO DE COLESTEROL.....	22
<i>DOMINIO SENSOR DE ESTEROLES</i>	22
<i>DOMINIO CRAC</i>	22
<i>DOMINIO CARC</i>	23
<i>OTRAS SECUENCIAS INESPECÍFICAS</i>	23
ANTECEDENTES DIRECTOS	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6. RESULTADOS.....	45
<i>SOBREEXPRESIÓN TRANSITORIA DE LAS PROTEÍNAS FUSIÓN SIDT1-EGFP O SDIT2-EGFP</i>	45
<i>INTERACCIÓN DIRECTA ENTRE SDIT1 Y COLESTEROL</i>	45
<i>INTERACCIÓN DIRECTA ENTRE SDIT2 Y COLESTEROL</i>	49
<i>PREDICCIÓN DE UN MODELO PARA LA PROTEÍNA SIDT1.</i>	49
<i>RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 AL DISMINUIR EL COLESTEROL EN LA MEMBRANA CELULAR</i>	53

<i>RELOCALIZACIÓN DE LAS MUTANTES DE SDIT1 A LA MEMBRANA PLASMÁTICA</i>	55
<i>SDIT1 SE ASOCIA AL COLESTEROL EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.</i>	57
<i>LA RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 ES DEPENDIENTE DE ENERGÍA.</i>	61
<i>LA RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 NO DEPENDE DE CITOESQUELETO</i>	62
<i>LA RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 COLOCALIZA CON CLATRINA PERO ÉSTAS NO INTERACCIONAN DIRECTAMENTE.</i>	64
<i>PREDICCIÓN DE ÁCIDO CÓLICO COMO LIGANDO TEÓRICO DE SDIT1</i>	66
7. DISCUSIÓN	68
8. CONCLUSIONES.....	71
9. PERSPECTIVAS.....	72
10. REFERENCIAS.....	73

Figuras

Figura 1.1 Estructura del colesterol.....	12
Figura 1.2 Esquema general del transporte de lípidos en el organismo	16
Figura 1.3 Principales mecanismos de internalización y excreción de colesterol en los enterocitos.....	19
Figura 1.4 Mecanismos de transporte intracelular de colesterol.....	20
Figura 1.5 Análisis filogenético de los homólogos de ChUP-1.....	25
Figura 1.6 Alineamiento de los dominios CRAC conservados en ChUP-1 y sus homólogos...	25
Figura 1.7 Sobreexpresión de SDIT1 o SDIT2 no aumenta internalización de dsRNA	26
Figura 1.8 Localización subcelular de las proteínas SDIT1 o SIDT2	27
Figura 1.9 SIDT1 o SDIT2 se localizan en endosomas de colesterol	28
Figura 6.1 sobreexpresión de las proteínas SDIT1 o SIDT2.....	45
Figura 6.2 SIDT1 interacciona con colesterol.....	48
Figura 6.3 Modelo en tres dimensiones de SIDT1	49
Figura 6.4 Modelo para las proteínas SID1 y ChUP-1	50
Figura 6.5 Dominios CRAC de la proteína SIDT1	51
Figura 6.6 Relocalización de la proteína SIDT1 hacia la membrana plasmática.....	54
Figura 6.7 Relocalización de las mutantes de SIDT1 hacia la membrana plasmática.....	58
Figura 6.8 SIDT1 interacciona con el colesterol en la membrana plasmática	60
Figura 6.9 La relocalización de SDIT1 a la membrana plasmática depende de la energía celular.....	62
Figura 6.10 La relocalización de SDIT1 a la membrana plasmática es independiente de citoesqueleto	65
Figura 6.11 SDIT1 colocaliza con clatrina.....	66
Figura 6.12 Modelo para la unión de SDIT1 con colato.....	67

Tablas

Tabla 5.1 Características de las imágenes para medir eficiencia de FRET.....	38
Tabla 5.2 Fármacos utilizados para evaluar la dependencia de la relocalización de SIDT1 a la membrana celular.	44
Tabla 6.1 Secuencias consenso de señales de vesiculación.....	52

Abreviaturas

SIDT1: SID1 transmembrane family member 1

SIDT1 wt: protein SDIT1 nativa

SIDT1 dm: Proteína SDIT1 doble mutante

SIDT1 ex: Proteína SIDT1 mutada en la tirosina de la región extracelular

SIDT1 tr: Proteína SIDT1 mutada en la tirosina dentro del cruce transmembranal

SDIT2: SID1 transmembrane family member 2

dsRNA: RNA de doble cadena

FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia/tipo Förster

TIRFM: Microscopía de fluorescencia por reflexión interna total

DHE: Dehidroergosterol

CRAC: Cholesterol Recognition/Interaction Aminoacid Consensus

Apo: apolipoproteína

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

LDL: Lipoproteína de baja densidad

HDL: Lipoproteína de alta densidad

NPC1: Nieman-Pick disease, type C1 protein

NPC1L1: NPC1 like protein 1

ChUP-1: Cholesterol uptake protein 1

1. Introducción

Los esteroides son un grupo específico de lípidos los cuales poseen una estructura característica formada por un núcleo esteroideo de cuatro anillos fusionados, tres de los cuales constan de seis átomos de carbono y el último únicamente de cinco. La estructura del núcleo es casi totalmente plana, lo que le confiere cierta rigidez a la molécula e impide la libre rotación en los enlaces carbono-carbono¹. El colesterol es el principal esteroide presente en los tejidos animales², el cual presenta propiedades anfipáticas al ser una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, que presenta una cabeza polar en el grupo hidroxilo del Carbono-3 y el resto de su estructura consta de un esqueleto hidrocarbonado no polar. Posee dos radicales metilo en los carbonos 10 y 13, una cadena alifática de ocho carbonos en la posición 17 y una insaturación entre los carbonos 5 y 6^{3,4}.

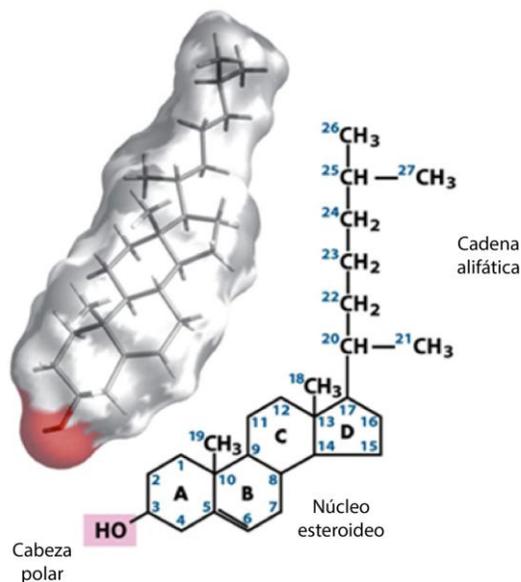


Figura 1.1 Estructura del colesterol. Esquema representativo de la numeración de los átomos de carbono en el colesterol y los anillos designados de A-D en el núcleo esteroideo. También se muestra una representación de la densidad electrónica de la molécula indicando en rojo la porción hidrofílica correspondiente al grupo hidroxilo.

Funciones biológicas del colesterol

El colesterol es uno de los compuestos más abundantes en las membranas biológicas de los organismos eucariontes, el cual es crucial para su organización, dinámica y función^{4,5}. Además en las células de mamíferos funciona como precursor de diversos compuestos de

importancia biológica con una gran diversidad de actividades, tal como las hormonas esteroideas, los ácidos biliares y la vitamina D^{1,6,7}.

El colesterol se encuentra presente en las membranas, distribuido de una manera heterogénea en las llamadas balsas lipídicas, que son dominios membranales ricos en colesterol y esfingolípidos⁸. La función estructural que desarrolla el colesterol dentro de las membranas biológicas confiere cierto orden y rigidez, estabilizando la posición de las cadenas de los ácidos grasos presentes dentro de la bicapa lipídica, mediante interacciones de van der Waals, haciendo que éstas sean menos fluidas.⁹ Estas regiones membranales se han propuesto como microdominios en la membrana que forman “plataformas” donde se reclutan proteínas y lípidos específicos para llevar a cabo una gran variedad de procesos como señalización y tráfico intracelular de moléculas por mencionar algunos ejemplos^{9,10}.

El retículo endoplásmico (ER) liso es el sitio donde se lleva a cabo la síntesis *de novo* del colesterol, también dónde éste es modificado para dar lugar a otros compuestos esteroideos. En los animales la mayor parte del colesterol es sintetizado en el hígado y ahí mismo es donde puede ser convertido en ácidos biliares, tales como el colato y el glicocolato, compuestos que son encargados de la emulsificación de las grasas ingeridas, al ser secretados al intestino para su posterior absorción¹¹.

Las hormonas esteroideas son importantes compuestos que se encargan de la señalización celular, modulación del metabolismo y expresión de genes. Un primer grupo de hormonas abarca a las hormonas sexuales, involucradas principalmente en la maduración sexual y el desarrollo de características sexuales secundarias en los organismos. Inicialmente se sintetiza la pregnolona, que se forma directamente a partir del colesterol, y así mismo, ésta da lugar a la formación de la progesterona. La progesterona es una hormona sexual precursora, tanto de la testosterona como del estradiol⁴.

A partir de la progesterona se derivan otras hormonas además de las sexuales. La cortisona es un ejemplo de los glucocorticoides, hormonas involucradas en la regulación de la gluconeogénesis y en la reducción de la respuesta inflamatoria. Los mineralocorticoides son

otro grupo, que participan en la regulación de la homeostasis de electrolitos (iones inorgánicos tales como el Na^+ , Cl^- y HCO_3^-) y del agua en los riñones, un ejemplo de éstas es la aldosterona. Todas las modificaciones que se llevan a cabo para la síntesis de hormonas que involucran tanto la hidroxilación como la oxigenación, son catalizadas por oxidasas de funciones compuestas que utilizan NADPH, O_2 y el citocromo P-450 de la mitocondria^{4,7}.

Por último el colesterol también es precursor de la vitamina D, la cual se forma a partir del 7-dehidrocolesterol, el cual reacciona con la luz UV en las células epiteliales produciendo colecalciferol, que posteriormente sufrirá modificaciones en el hígado y en los riñones para finalmente formar la vitamina D. Ésta actúa como un factor transcripcional para regular la homeostasis de calcio.

La complejidad de estos procesos celulares requiere de una interacción directa entre diferentes proteínas y el colesterol. Se han descrito diversos procesos celulares donde están involucradas proteínas que tienen interacción directa con el colesterol y que poseen funciones diversas mencionadas a continuación.

El transporte de colesterol se lleva a cabo desde un nivel sistémico en el que el colesterol es transportado a través de la circulación o a un nivel celular que puede ser la internalización y excreción del colesterol de las células, así como el transporte intracelular de colesterol en el que, el colesterol es transportado entre los diferentes compartimentos dentro de la célula.

Transporte de colesterol sistémico, a través de la circulación.

Debido a la naturaleza hidrofóbica e insoluble del colesterol, la cual no permite un óptimo desplazamiento de éste en la circulación por ser un medio acuoso, el movimiento de los ésteres de colesterol y del mismo colesterol en el plasma sanguíneo se lleva a cabo a través de un tipo de proteínas acarreadoras llamadas lipoproteínas, que son complejos macromoleculares formados por la combinación de las apolipoproteínas y fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos^{1,7}.

Existen diversas clases de lipoproteínas, dependiendo de la relación del porcentaje proteico y lipídico que las conforman, confiriéndoles una mayor o menor densidad. Los quilomicrones son las lipoproteínas más grandes pero de menor densidad, con grandes cantidades de triglicéridos, estas se encargan de movilizar triglicéridos del intestino hacia otros tejidos. Los quilomicrones son sintetizados en el ER de las células epiteliales intestinales y se desplazan por el sistema linfático para entrar a los vasos sanguíneos. Las apolipoproteínas que conforman los quilomicrones incluyen apoB-48, apoE y apoC-II, ésta última activa la lipasa de lipoproteínas en los capilares del tejido adiposo, corazón y músculo permitiendo la liberación de los ácidos grasos en estos sitios para ser utilizados como fuente de energía. Los remanentes de los quilomicrones, una vez ya liberados los ácidos grasos, (apolipoproteínas y colesterol) se mueven por el torrente sanguíneo hasta el hígado donde son endocitados y el colesterol es liberado mientras que los demás componentes son degradados^{1,4}.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very low density lipoproteins*) constan de apolipoproteínas (apoB-100, apoC-I, II, III y apoE) y triacilgliceroles que sirven para acarrear ácidos grasos que se necesitan como fuente de energía inmediata; estas lipoproteínas son transportadas del hígado a los demás tejidos mediante el torrente sanguíneo. Una vez liberados los triacilgliceroles, mediante la acción igualmente de la apoB-II se forman las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las cuales contienen mayoritariamente colesterol y ésteres de colesterol. Las LDL transportan colesterol a las células que presentan los receptores de membrana específicos que reconocen la apoB-100^{1,4,12,13} (Figura 1.2).

Otro tipo de lipoproteínas son las de alta densidad (HDL), que se producen en el hígado y en el intestino delgado; están constituidas principalmente por partículas proteicas con poco colesterol y sin ésteres de colesterol ni ácidos grasos. Las HDL contienen apoA-I, apoC-I, apoC-II principalmente. La enzima encargada de transferir los remanentes de quilomicrones y VLDLs a la superficie de una nueva HDL para su maduración es la LCAT (*lecithin-cholesterol acyl transferase*). Una vez ya madura la HDL es capaz de migrar hacia el hígado, donde el colesterol es liberado y una proporción se transforma en sales biliares. Las HDL son internalizadas en el

hígado mediante endocitosis, pero también en algunos otros tejidos esterogénicos pueden liberar moléculas de colesterol por la acción de los receptores de membrana SR-BI^{1,4,14}.

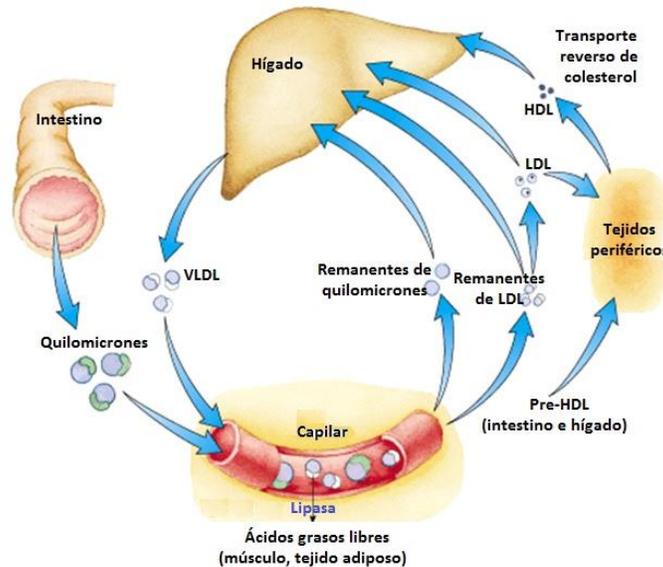


Figura 1.2 Esquema general del transporte de lípidos en el organismo. Los lípidos incluyendo al colesterol son transportados a través de la circulación en el organismo. La absorción del colesterol toma lugar en el intestino y ahí es empaquetado al igual que otros lípidos en los quilomicrones para ser transportados hacia el hígado. Del hígado es distribuido hacia los tejidos periféricos principalmente en LDL. Y el colesterol proveniente de los tejidos periféricos puede regresar al hígado en forma de HDL.

Transporte de colesterol en las células

El transporte de colesterol hacia el interior de las células es un proceso importante en los mamíferos, ya que de todo el colesterol necesario para satisfacer las necesidades celulares, la gran mayoría (del 60% al 90%) se obtiene a partir de la dieta^{15,16}. Lo anterior ocurre sin importar que todas las células tengan la capacidad de sintetizar colesterol, debido al alto costo energético que se requiere para llevar a cabo la síntesis *de novo* debido a que están involucradas más de treinta reacciones enzimáticas para llevar a cabo la síntesis a partir de moléculas de acetil-CoA, favoreciéndose la absorción del mismo de la dieta.

Internalización de colesterol

Los mecanismos de internalización de colesterol a la célula que han sido descritos principalmente son los que involucran procesos de endocitosis mediada por receptor, como es el caso de las lipoproteínas de baja y de alta densidad que mediante receptores específicos que

están localizados en la membrana, son endocitados por vesículas de clatrina que las transportan hacia endosomas, endosomas tardíos y lisosomas para degradar sus componentes o reciclar los que se utilizaran de nuevo. Sin embargo hace poco tiempo se describió el primer mecanismo mediante el cual se internaliza el colesterol proveniente de la dieta, es decir, el colesterol libre dentro del intestino.

Durante mucho tiempo se desconocía el mecanismo mediante el cual la célula absorbía colesterol e incluso hasta hoy en día los mecanismos mediante los cuales la célula se encarga de distribuir el colesterol en sus diferentes compartimentos no son bien comprendidos. En un principio se pensaba que el colesterol absorbido en el intestino por los enterocitos se llevaba a cabo de manera pasiva por difusión.

Fue hasta el 2004 cuando se describió por primera vez una proteína involucrada en el transporte del colesterol hacia el interior de las células en el intestino, esto fue gracias al desarrollo de un fármaco capaz de disminuir los niveles de colesterol en plasma sanguíneo, el ezetimibe, así como el uso de herramientas bioinformáticas para determinar posibles candidatos que pudieran ser blanco de dicho fármaco¹⁷. Estos estudios llevaron a la identificación de una proteína transmembranal denominada NPC1L1 (Nieman-Pick C1-Like 1 Protein)^{11,17-19}, dada la similitud que presenta con la proteína NPC1, responsable del síndrome de Nieman-Pick, que causa la acumulación intracelular de esteroides en vesículas²⁰.

La principal función atribuida a la NPC1L1 es la de un transportador presente en la porción proximal del yeyuno, esencial para la absorción y reabsorción de colesterol y fitosteroides provenientes del intestino y del hígado. Esta proteína de 13 segmentos transmembranales contiene un dominio sensor de esteroles, con N-glicosilaciones que le confieren un peso molecular de aproximadamente 175 kDa.¹⁴ El mecanismo exacto de transporte de colesterol mediado por esta proteína aún no ha sido totalmente dilucidado, hasta el momento se sabe que: el transporte de colesterol es muy selectivo, los ésteres de colesterol y de otros esteroides no se unen a esta proteína y que el transporte de colesterol es unidireccional y requiere K⁺ intracelular¹¹.

Se han identificado algunas otras proteínas que participan en procesos de transporte de colesterol hacia el interior de diversos tipos celulares, principalmente se ha descrito su presencia en células intestinales y en hepatocitos^{11,21,22}. Tales como la familia de proteínas transportadoras ABC, (ATP-Binding Cassette)²¹, las cuales poseen dos dominios formados por seis hélices transmembranales. Estas proteínas recientemente se han relacionado con la excreción de colesterol de las células.

Los genes *AbcG5* y *AbcG8* codifican para dos monómeros de transportadores, los cuales para ser activos tienen que formar un homodímero. Estos genes son los homólogos en mamíferos del gen de *Drosophila white*¹⁴, involucrado en la absorción de los pigmentos para los ojos, determinando su color. La estructura de los miembros de ésta familia consta de un motivo de cassette de unión a ATP en la región amino terminal, seguido de seis segmentos de dominios transmembranales, además de presentar en una región intermedia un motivo característico de los transportadores ABC¹¹.

La función de estos transportadores parece involucrar un bombeo hacia el medio extracelular, tanto de colesterol como de fitoesteroles. Éstos transportadores no han sido totalmente caracterizados, ya que el mecanismo de exportación aún no se comprende del todo. Se ha propuesto la hipótesis de que actúan como “flipasas” llevando las moléculas de colesterol de la cara interna de la membrana plasmática hacia la externa y así dejan expuesto el colesterol para que posteriormente sus aceptores lleven a cabo su extracción¹¹.

Existen además, otras proteínas posiblemente involucradas en el transporte de colesterol, tal es el caso de CD36 (cluster domain 36) un receptor tipo “scavenger” que interviene en la incorporación del colesterol a nivel del intestino proximal, pero también en la excreción de colesterol en el intestino distal de ratones¹⁴.

La aminopeptidasa (APN) también parece estar involucrada en el transporte de colesterol al interior de los enterocitos²², dado que participa en procesos de endocitosis que involucran grandes regiones ricas en colesterol sin embargo no se ha encontrado evidencia de interacciones directas a esta proteína con colesterol.

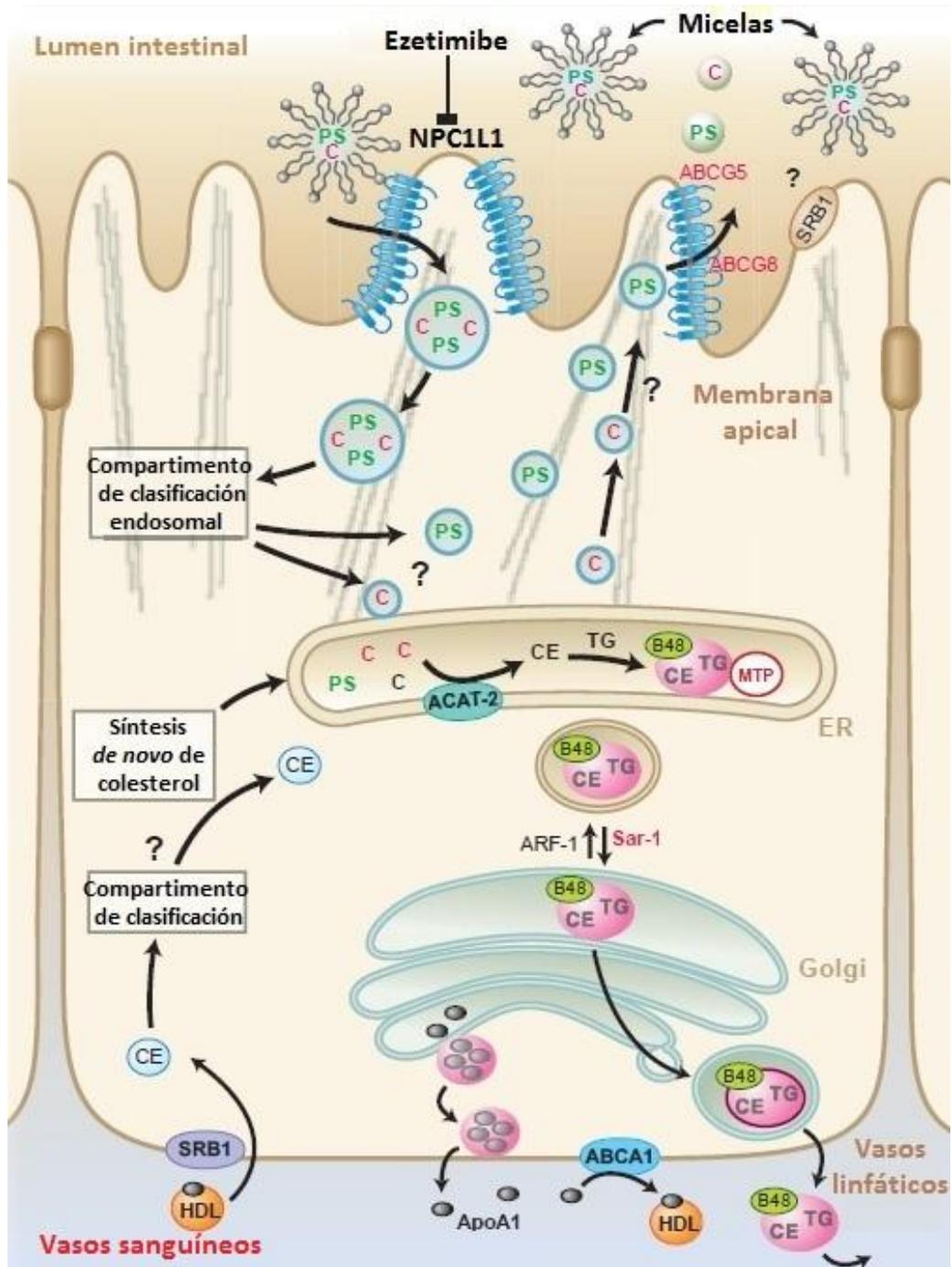


Figura 1.3 Principales mecanismos de internalización y excreción de colesterol en los enterocitos. La proteína NPC1L1 es la encargada de internalizar el colesterol desde el lumen del intestino hacia el interior de las células, el ezetimibe es un fármaco que bloquea su actividad de internalización. Los transportadores ABCG5 y ABCG8 también están involucrados tanto en la internalización de colesterol y fitoesteroles así como en la excreción del exceso de fitoesteroles. Una vez internalizado el colesterol su principal destino es el compartimento de reciclaje endosomal de ahí es transportado hacia el retículo endoplásmico donde el colesterol es esterificado por la enzima ACAT2 para luego ensamblarse en los quilomicrones y éstos ser secretados al torrente sanguíneo. De igual manera el colesterol sintetizado *de novo* en el retículo endoplásmico puede ser esterificado y ensamblarse en los quilomicrones. (Erick L. Klett & Shailesh B. Patel, 2004)

Transporte intracelular de colesterol

Por otro lado, además de los mecanismos mediante los cuales las células llevan a cabo la internalización de colesterol, existen rutas que aún no se conocen del todo, mediante las cuales el colesterol se transporta intracelularmente. Lo anterior facilita la distribución de colesterol en los diversos compartimentos celulares y su posterior almacenamiento como ésteres de colesterol en el caso de los adipocitos⁴.

Se han establecido tres mecanismos básicos para el transporte de colesterol (Figura 1.4) entre las membranas dentro de la célula, que son: el transporte vesicular de un organelo a otro, un proceso que requiere energía en forma de ATP²³⁻²⁶. Un segundo mecanismo puede ser mediante difusión mediada por proteínas acarreadoras a través del citoplasma; un ejemplo importante está dado en el transporte del colesterol de la membrana plasmática hacia los compartimentos de reciclaje endosomal (ERC)^{4,12} o el último mecanismo se da mediante el contacto directo entre las membranas²⁵.

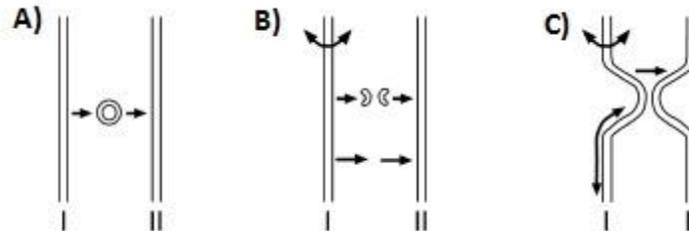


Figura 1.4 Mecanismos de transporte intracelular de colesterol. El transporte de colesterol dentro de la célula de un organelo a otro se puede llevar a cabo mediante transporte por vesículas (A), difusión mediada por proteínas acarreadoras de colesterol (B) o por el contacto directo de las membranas intracelulares. (Daniel Wüstner & F. R. Maxfield, 2002)

El mecanismo mediado por proteínas acarreadoras de colesterol en el citoplasma, aún permanece sin esclarecerse, sin embargo hay un número creciente de proteínas que se postulan como candidatos a desempeñar funciones clave en este mecanismo de transporte. Tal es el caso de las proteínas ORPs (*OSBP-Related Proteins*), proteínas citosólicas que parecen estar involucradas en el transporte de esteroides entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi²⁴. Otro ejemplo de estas proteínas ha sido propuesto para el transporte de colesterol hacia el compartimento de reciclaje endosomal (ERC) en el cual al agotar el ATP de las células,

se inhibe completamente la endocitosis de los receptores de transferrina pero la translocación de colesterol sigue llevándose a cabo^{24,26}.

El transporte de colesterol mediado por vesículas se ha estudiado durante los últimos años para tratar de encontrar las proteínas involucradas en este proceso, principalmente se han encontrado evidencias de interacciones del colesterol con proteínas involucradas en la endocitosis, tal es el caso de las caveolinas, los componentes proteicos necesarios para la formación de las caveolas, que son invaginaciones membranales características por su forma de Ω (Omega) invertida ricas en colesterol, esfingolípidos y proteínas que están involucradas en procesos de señalización así como también en rutas endocíticas independientes de clatrina.

Otra clase de endocitosis es la dependiente de clatrina¹, la cual necesita dichas proteínas para ensamblar las vesículas además de proteínas accesorias AP1 y AP2; de las cuales AP2 está involucrada en la formación de vesículas con clatrina desde la membrana plasmática para el proceso de endocitosis, mientras que AP1 interviene en la formación de vesículas provenientes del aparato de Golgi¹³.

Recientemente otra clase de proteínas las Flotilinas (1 y 2) han sido involucradas en el transporte vesiculado incluyendo procesos endocíticos, dichas proteínas pertenecen a la familia SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HFLK,C proteins*)²⁷. Inicialmente fueron identificadas como proteínas presentes en regiones membranales resistentes a detergentes, haciéndolas un buen marcador de balsas lipídicas.

Las flotilinas poseen una topología similar a las caveolinas aunque no tienen ninguna relación en cuanto a su secuencia de aminoácidos poseen la capacidad de formar microdominios. También han sido relacionadas con una amplia variedad de procesos celulares en los cuales pudieran estar involucradas, como en señalización celular actuando como plataformas para iniciar cascadas de señalización provenientes de la membrana plasmática y la posibilidad de ser fosforiladas por acción de cinasas²⁸, también han sido relacionadas con la formación de microdominios que interactúan con citoesqueleto, principalmente con filamentos

de actina cortical, dando pauta a proponer que están involucradas en procesos de polarización celular así como a respuestas quimiotácticas²⁸.

En cuanto a la relación de las flotilinas con endocitosis se ha visto que promueven la internalización de algunos tipos de moléculas particulares pudiendo tener interacciones tanto con dinamina como con el esqueleto de actina para su transporte^{27,28}. También se tiene evidencia de que procesos endocíticos independientes de clatrina o caveolina los cuales pueden ser rutas dependientes de flotilina 1²⁹.

En el caso particular de transporte de colesterol se tiene evidencia de la dependencia específica en cuanto a la incorporación mediada por la proteína NPC1L1 y los niveles de expresión de las flotilinas, dado que la sobreexpresión de ambas proteínas conjuntamente es necesaria para que se incremente la incorporación de colesterol en los enterocitos¹⁵.

Secuencias proteicas de reconocimiento de colesterol.

Además de los mecanismos de transporte de colesterol descritos anteriormente, existen una gran variedad de procesos celulares en los que se requiere una interacción directa entre el colesterol y diversas proteínas. Dentro del grupo de proteínas que se ha identificado que interactúan con colesterol se han encontrado diferentes secuencias peptídicas específicas a las que se les ha atribuido la capacidad de dicha interacción, algunas de estas secuencias son:

Dominio sensor de esteroides

El SSD, (*Sterol Sensing Domain*) los cuales comprenden cinco cruces transmembranales en varias proteínas que principalmente están involucradas en la homeostasis de colesterol como HMG-CoA reductasa, 7-dehidrocolesterol reductasa, NPC1 por mencionar algunas.^{14,15,17,18,20,30}

Dominio CRAC

El dominio CRAC (*Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Sequence*) se ha propuesto como un conjunto de aminoácidos que reconocen o interactúan con colesterol. Su secuencia consenso está dada por L/V-X(1-5)-Y-X(1,5)-R/K, en donde X(1-5) representa la

presencia de 1 a 5 aminoácidos cualesquiera. La tirosina tiene una importancia particular, dado que se ha establecido una relación directa entre ésta y la capacidad de unión a colesterol de la proteína³¹.

A partir de esta secuencia se han identificado una amplia variedad de proteínas que interaccionan mediante este dominio con el colesterol, desde receptores acoplados a proteínas G, los cuales necesitan al colesterol para llevar a cabo su función al unir su ligando, así como proteínas virales que requieren interacción con colesterol para poder llevar a cabo el proceso de infección, además de proteínas en otros organismos como en el nematodo *C. elegans* en el cual una proteína caracterizada por tener un sitio CRAC es responsable de la internalización de colesterol proveniente de la dieta^{3,32,33}.

Dominio CARC

Dominio CARC cuya secuencia es igual a la del dominio CRAC pero con el orden invertido de la posición de los aminoácidos , R/K-X(1-5)-Y/F-X(1-5)-L/V, además que la tirosina central ahora también puede ser sustituida por una fenilalanina³⁴.

Otras secuencias inespecíficas

Existen además otras secuencias a las que se les atribuye una interacción directa con colesterol las cuales poseen generalmente una tirosina para establecer dicha interacción o algunas otras secuencias que se encargan de inserción a la membrana y que también reconocen colesterol, sin embargo éstas no han sido claramente caracterizadas debido a su reciente descubrimiento^{34,35}.

Antecedentes directos

Utilizando como modelo de estudio al nematodo *Caenorhabditis elegans* debido a que es un organismo auxótrofo para colesterol, previamente en el laboratorio durante la realización del proyecto de doctorado realizado por Víctor Julián Valdés Rodríguez se identificó la proteína ChUP-1 como el primer miembro de una nueva familia de proteínas involucradas en el transporte de colesterol^{3,32}.

ChUP-1 es una proteína con nueve cruces transmembranales, una región extracelular en la porción del amino terminal y una porción citoplasmática correspondiente al carboxilo terminal. En su secuencia de aminoácidos se identificaron dos dominios CRAC, para la interacción con colesterol, el primero en la región del carboxilo terminal y el segundo dentro del quinto segmento transmembranal. Se determinó que esta proteína está involucrada directamente en la internalización del colesterol en el nematodo, ya que funciona como un transportador de colesterol hacia el interior de las células intestinales de este organismo^{3,32}.

Hasta antes de la identificación de la ChUP-1 no se conocía un mecanismo directo mediante el cual se pudiera describir el proceso de internalización del colesterol proveniente de la dieta del nematodo³.

Un análisis filogenético por medio de la secuencia de aminoácidos (Figura 1.5) identificó homólogos de la proteína ChUP-1 (*Cholesterol Uptake Protein 1*) en otros organismos dentro de las cuales están las proteínas SIDT1 de humano y SIDT2 de ratón. Actualmente los únicos datos reportados que se tienen de estas dos proteínas proponen que ambas actúan como transportadores de RNA de doble cadena (dsRNA) hacia el interior de las células habiendo sido establecidas como homólogos a SID1 (con un 16% de identidad), la cual es un translocador dsRNA^{36,37}.

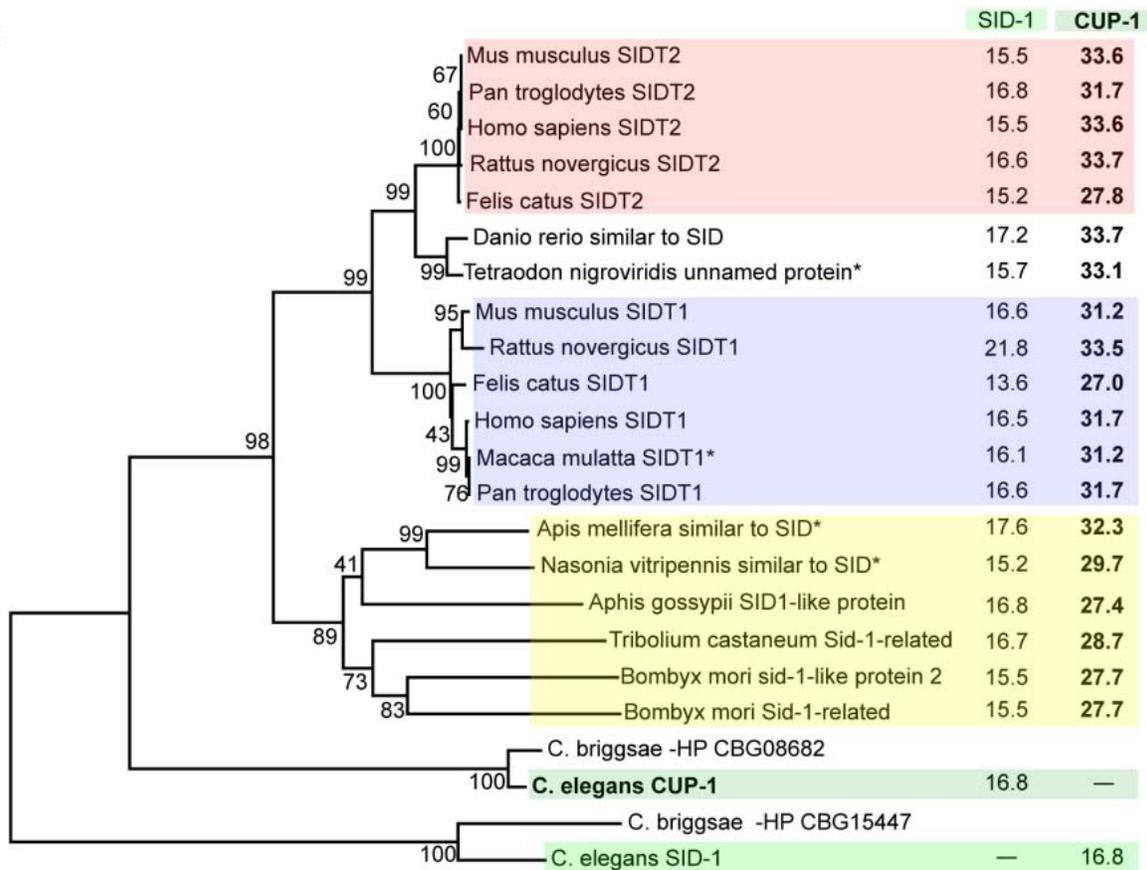


Figura 1.5 Análisis filogenético de los homólogos de ChUP-1. Alineamiento múltiple de secuencias usado para generar un árbol filogenético por el método de máxima similitud. El porcentaje de similitud entre las proteínas se indica a la derecha. Las proteínas SDIT1 de humano y SDIT2 de ratón presentan un porcentaje de identidad mayor a ChUP-1 que a SID1. (Víctor Julián Valdés Rodríguez, 2012)

Se identificaron dos dominios CRAC conservados en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas al igual que en la proteína ChuP1 (Figura 1.6) sugiriendo que podría existir una interacción directa entre estas proteínas y el colesterol en las células.

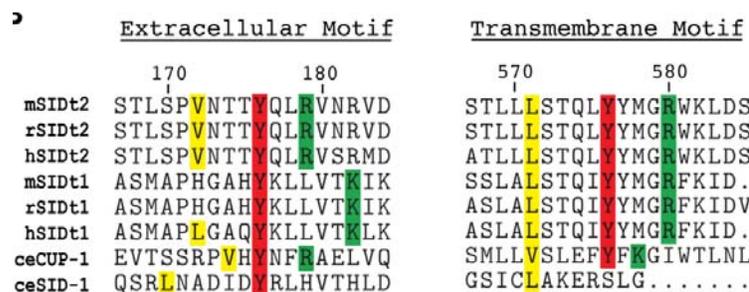


Figura 1.6 Alineamiento de los dominios CRAC conservados en ChUP-1 y sus homólogos. Los números indican la posición de los aminoácidos en ChUP-1. m: ratón; h: humano; r: rata; ce: *C. elegans*. (Víctor Julián Valdés Rodríguez, 2012)

Así mismo otros datos obtenidos en el laboratorio descartaron la posibilidad de que SIDT1 o SIDT2 sean transportadores de dsRNA (Figura 1.7), lo cual deja abierta la posibilidad de que las proteínas SIDT1 y/o SIDT2 puedan estar involucradas en el transporte intracelular de colesterol en las células de mamíferos.

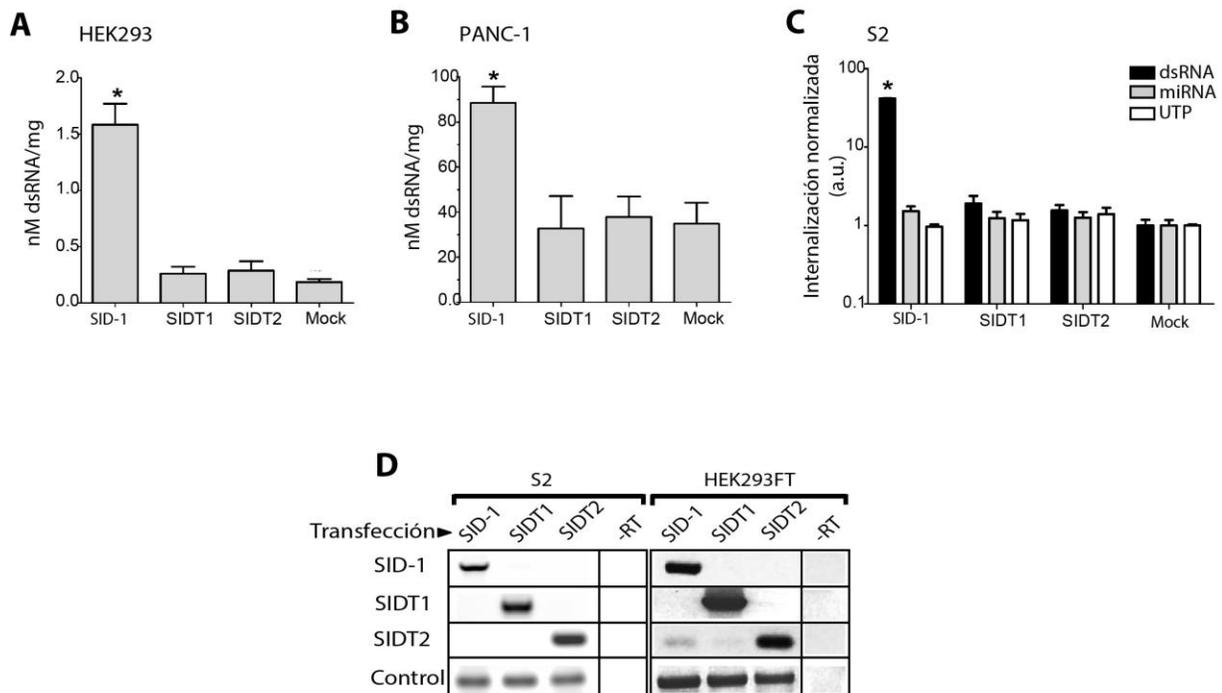


Figura 1.7 Sobreexpresión de SIDT1 o SIDT2 no aumenta internalización de dsRNA. Células HEK 293 FT (A) o células PANC-1 (B) fueron transfectadas con SID1 de *C. elegans* o SIDT1 humano o SIDT2 de ratón o un plásmido vacío (*mock*) y éstas fueron incubadas con 5 μ g/ml de dsRNA marcado radioactivamente por 2 horas a 37°C. La molaridad fue calculada a partir de la secuencia del dsRNA y normalizada con la cantidad de proteína total de cada muestra. Barra de error: desviación estándar; $n > 5$; * $p < 0.01$. (C) Células S2 de *Drosophila* incubada durante 4 horas a 37°C con: dsRNA (700nt), miRNA (pre-let-7A) o su equivalente en c.p.m con P32- γ -UTP. La internalización fue normalizada con la proteína total de cada muestra; u.a. unidades arbitrarias. (D) RT-PCR de cada una de las transfecciones en las células S2. Los genes de actina y GADPH de insecto fueron utilizados como controles. -RT control sin transcriptasa reversa. (Víctor Julián Valdés Rodríguez, 2012)

Mediante un análisis de colocalización con marcadores de distintos organelos se determinó que las proteínas SIDT1 y SIDT2 se localizan en las membranas de algunos organelos celulares y en la membrana plasmática de la célula (Figura 1.8).

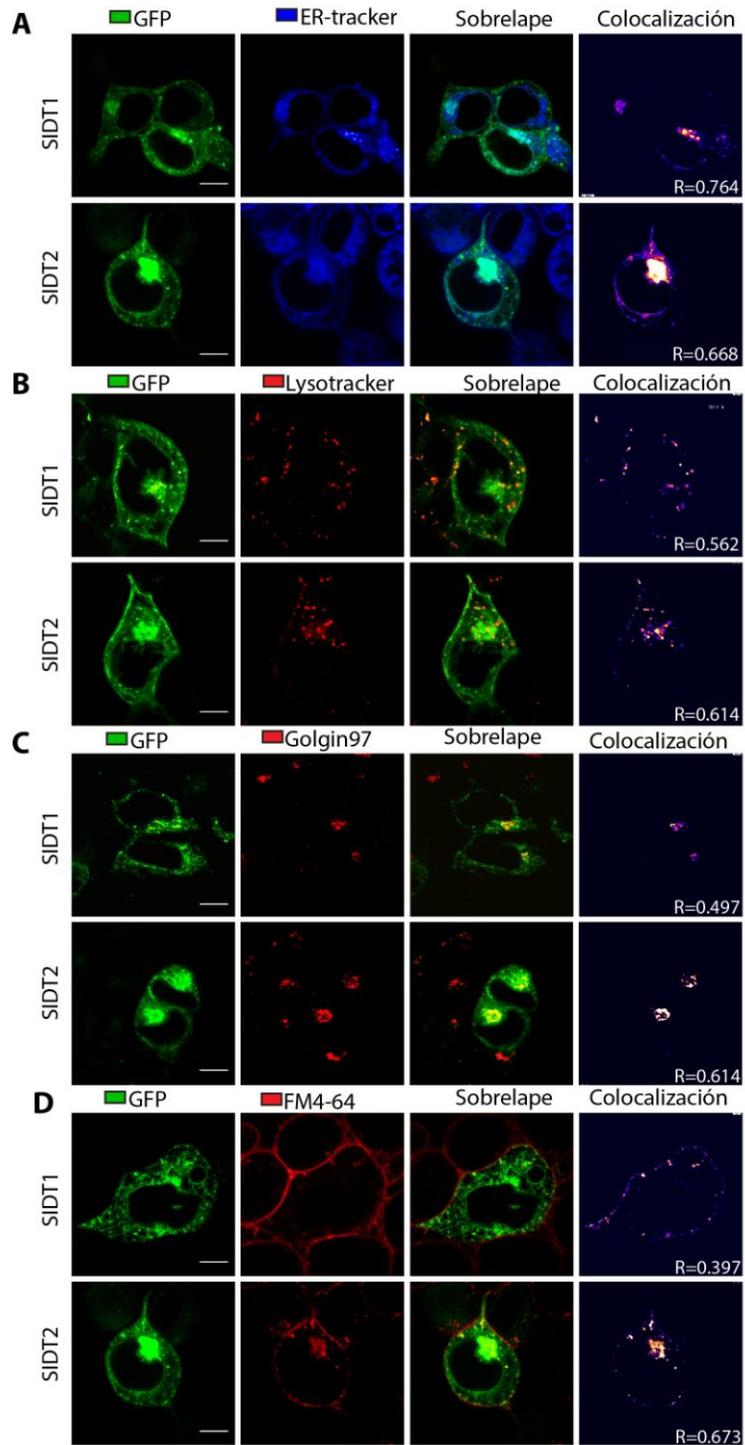


Figura 1.8 Localización subcelular de las proteínas SIDT1 o SIDT2. Imágenes representativas de células HEK 293 FT que sobreexpresaban las proteínas SIDT1 o SIDT2 fusionadas con EGFP y que fueron incubadas con marcadores fluorescentes específicos de distintos organelos. (A) Retículo endoplásmico. (B) Lisosomas. (C) Aparato de Golgi. (D) Membrana plasmática. R: coeficiente de colocalización de Manders. Barra de escala: 10 μ m. (Victor Julián Valdés Rodríguez, 2012)

Además también mediante un análisis de colocalización, se observó que las proteínas están presentes en endosomas que contienen colesterol (Figura 1.9). Esto sugiere que estas proteínas podrían estar involucradas en el transporte intracelular de colesterol.

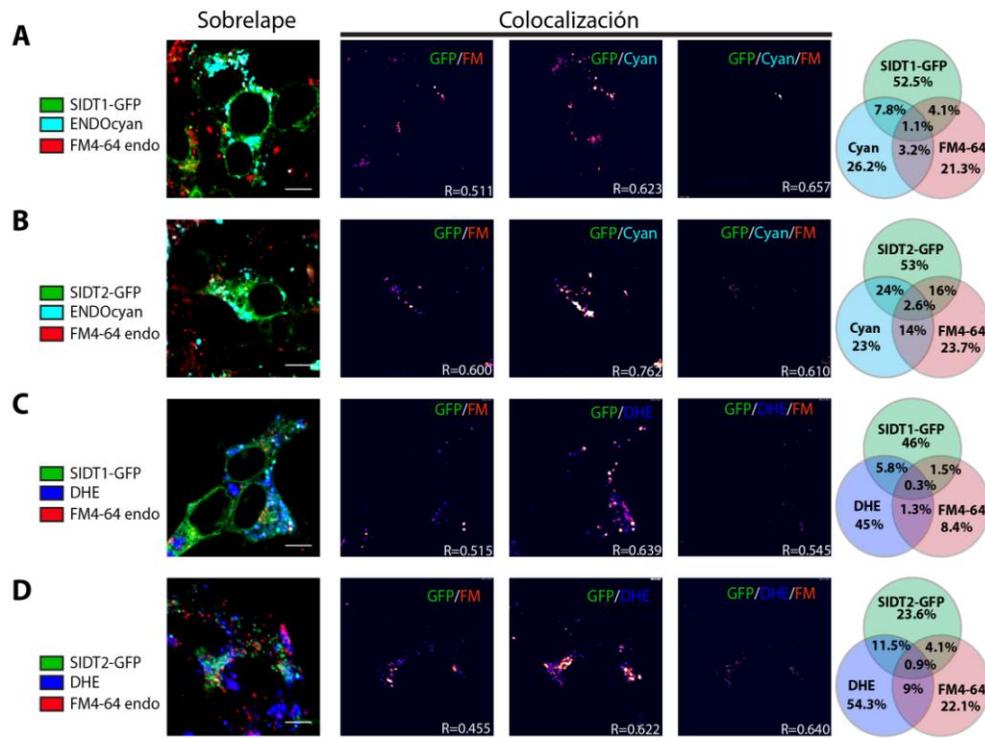


Figura 1.9 SIDT1 o SIDT2 se localizan en endosomas de colesterol. Células que sobreexpresaban establemente SIDT1 humano o SIDT2 de ratón fusionadas con EGFP fueron transfectadas con EndoCyan (A y B) o incubadas con DHE (C y D). Posteriormente las células fueron incubadas con FM4-64 por 2 horas y se evaluó la colocalización mediante microscopía confocal. El porcentaje de colocalización fue calculado por densitometría, donde el 100% corresponde a la suma de los tres canales (rojo, azul y verde). R: coeficiente de colocalización de Manders. Barra de escala: 10 μ m. (V́ctor Julián Valdés Rodŕguez, 2012)

2. Justificación

Mediante un análisis bioinformático se determinó que las proteínas SIDT1 y SIDT2 son homólogas a ChUP-1, una proteína involucrada en el transporte de colesterol en *Caenorhabditis elegans*. Por lo tanto es posible que ambas proteínas homólogas también tengan una función relacionada con el transporte de colesterol en células de mamífero porque además contienen los dominios CRAC conservados que se identificaron dentro de la secuencia de la proteína ChUP-1.

Esto es importante debido a que actualmente no se conoce mucho acerca de los mecanismos de transporte intracelular de colesterol y con este hallazgo se comenzaría a entender mejor cómo las células mantienen la homeostasis de colesterol para satisfacer sus necesidades de manera adecuada.

3. Hipótesis

Las proteínas SIDT1 y SIDT2 están involucradas en el transporte de colesterol en las células de mamífero.

4. Objetivos

Determinar si las proteínas SIDT1 y SIDT2 están involucradas en el transporte intracelular de colesterol y cómo llevan a cabo su función.

Sobreexpresar las proteínas fusionadas con GFP en células HEK 293 FT.

Determinar la interacción entre las proteínas y el análogo fluorescente del colesterol (DHE) mediante FRET.

Evaluar la funcionalidad de los dominios CRAC mediante mutagénesis dirigida.

Determinar el efecto que causa la modificación de la concentración de colesterol en la membrana plasmática en células que sobreexpresan SIDT1-EGFP y SIDT2-EGFP mediante microscopía confocal.

5. Materiales y Métodos

El DHE (dehidroergosterol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol) y la metil- β -ciclodextrina fueron adquiridos de Sigma. El marcador de membrana FM4-64[®] fue adquirido de Invitrogen.

Soluciones utilizadas

Solución 1: 50mM Glucosa, 25mM Tris-HCl (pH8.0)

Solución 2: 0.2N NaOH, 1% SDS.

Solución 3: 3M acetato de potasio, 5M ácido acético.

Buffer TE: 10mM Tris (pH8.0), 1mM EDTA.

Solución PEG/NaCl: 20% PEG 8000, 2.5M NaCl.

HeBS 2x (pH7.05): 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄.

Medio de incubación "UNO": NaCl 150mM, KCl 5mM, CaCl₂ 5mM, MgCl₂ 5mM, glucosa 5mM, HEPES 20mM a pH 7.4.

Medio de incubación "DOS" (medio para dejar a las células sin energía disponible): NaCl 150mM, KCl 5mM, CaCl₂ 5mM, MgCl₂ 5mM, desoxiglucosa 50mM, NaN₃ 5mM, HEPES 20mM a pH 7.4.

Solución de transferencia húmeda (Bjerrum Schafer-Nielsen Buffer): 48mM TRIS, 39mM Glicina, 20% (v/v) Metanol.

El proceso de biología molecular para obtener las proteínas fusionadas SDIT1 y SIDT2 con EGFP fue realizado durante la tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas de Víctor Julián Valdés Rodríguez. El proceso involucro la clonación del gen para SIDT1 o SDIT2 en el plásmido EGFP N' para que la proteína fluorescente quedara en la región del carboxilo terminal.

Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados para los ensayos que se llevaron a cabo fueron los siguientes: EGFP N'-SIDT1, EGFP N'-SIDT2, mCherry-Clatrina (adquirido directamente de Addgene).

Cultivo celular

Las células utilizadas para todos los ensayos fueron HEK 293 FT (*Human Embryonic Kidney*) las cuales se crecieron sobre cubreobjetos redondos en cajas de 35 mm en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (BSF), antibiótico (penicilina/estreptomicina) y glutamina en condiciones de humedad a 37 °C y una atmósfera de CO₂ al 5%.

Purificación de los plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados fueron amplificados en cultivos bacterianos de *Escherichia coli* BL21 las cuales fueron transformadas y crecidas en platos de agar utilizando medio LB (Affymetrix) con 20 µg/ml de kanamicina a 37°C. La placa de cultivo se observó a simple vista para cerciorarse de que no hubiera colonias de microorganismos contaminantes. Las colonias sobre la placa eran homogéneas. Se tomó una sola colonia de la placa y se incubó en 5 ml de LB con 20µg/ml de kanamicina dejando en agitación por 12h a 37°C. Posteriormente se inocularon 250ml de LB con 500µl del medio anterior y se adicionaron 20µg/ml de kanamicina para dejarse en agitación a 37°C y 200rpm por 12h. Una vez transcurrido el tiempo se purificaron los plásmidos mediante un protocolo de purificación con PEG/NaCl el cual se describe a continuación:

Colectar las bacterias por centrifugación (9500rpm, 20minutos, 4°C).

Desechar el sobrenadante (SN) y resuspender el botón de bacterias en 5 ml de solución 1 y pasar a un tubo de centrifuga de 50 ml.

Añadir 10 ml de solución 2 e invertir 6 veces.

Añadir 7.5 ml de solución 3 e invertir 6 veces y agitar en vórtex 30 segundos.

Centrifugar (9500rpm, 20 minutos, 4°C)

Colectar únicamente el SN en un tubo de centrifuga de 50 ml.

Añadir un volumen igual de isopropanol e invertir 6 veces para dejar a -20°C por 25 minutos.

Centrifugar (9500rpm, 20 minutos, 4°C).

Decantar el SN y resuspender el botón en 2.5 ml de la solución amortiguadora TE.

Añadir 10 ml de LiCl 4 M y dejar en hielo durante 25 minutos.

Centrifugar (9500rpm, 20 minutos, 4°C)

Colectar el SN en un tubo de centrifuga de 50 ml y añadir un volumen igual de isopropanol, invertir 6 veces y dejar a -20°C por 25 minutos.

Centrifugar (9500 rpm, 25 minutos, 4°C).

Desechar el SN y resuspender el botón de DNA en 1 ml de solución amortiguadora TE para pasar a un tubo Eppendorf nuevo.

Añadir RNAsa A (concentración final de 100 ng/ml) e incubar a 37°C durante 30 minutos.

Centrifugar (13200 rpm, 10 minutos, 4°C).

Colectar el SN, añadir 500 µl de solución PEG/NaCl y dejar en hielo por 2 horas.

Centrifugar 2 veces (13200 rpm, 10min, 4°C).

Desechar el SN y lavar el botón de DNA con 1 ml de etanol al 70% (v/v).

Centrifugar (13200 rpm, 10 min, 4°C)

Desechar el SN, dejar secar el exceso y resuspender el botón de DNA en solución amortiguadora TE.

Una vez obtenido el plásmido purificado se cuantificó por espectrofotometría determinando la absorbancia de luz ultravioleta (con una longitud de onda de 260 nm) y comparando con un blanco (en este caso se utilizó la solución amortiguadora TE sola), para este procedimiento se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop® 2000.

Mutagénesis de los plásmidos EGFP N'-SDIT1 y EGFP N'-SIDT2

Para la mutagénesis de los plásmidos en sus dominios CRAC se utilizó una sustitución de la tirosina central por una glicina, esto debido a que la tirosina es necesaria para el reconocimiento del colesterol dentro de este dominio³⁸. Se utilizó el “QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene) siguiendo las instrucciones de fabricante³⁹ para realizar la sustitución se utilizaron los oligonucleótidos listados a continuación para cada sitio de mutagénesis subrayado:

hSIDT1 transmembranal

Forward 5' GCCCTCAGCACCCAGATAGGTTATATGGGTCGTTTCAAG 3'

Reverse 5' CTTGAAACGACCCATATAACCTATCTGGGTGCTGAGGGC 3'

hSIDT1 extracelular

Forward 5' CCCCTGGGTGCTCAGGGCAAACTGCTAGTTAC 3'

Reverse 5' GTAAC TAGCAGTTTGCCCTGAGCACCCAGGGG 3'

mSIDT2 transmembranal

forward 5' CTCAGCACTCAGCTCGGTTACATGGGCCGCTG 3'

reverse 5' CAGCGGCCCATGTAACCGAGCTGAGTGCTGAG 3'

mSIDT2 extracelular

forward 5' CACCCGTCAATACCACTGGCCAGCTCCGAGTCAAC 3'

reverse 5' GTTGACTCGGAGCTGGCCAGTGGTATTGACGGGTG 3'.

Posterior a la mutagénesis se llevó a cabo la amplificación de los plásmidos como se describió previamente y se secuenciaron a la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) para corroborar que la mutagénesis se llevó a cabo en los sitios correspondientes y que no se introdujeron mutaciones adicionales. Una vez obtenidas las secuencias éstas se analizaron utilizando el programa BioEdit⁴⁰.

Sobreexpresión transitoria de proteínas SIDT1 y SIDT2 fusionadas con GFP.

Las células HEK 293 FT se mantuvieron creciendo en medio DMEM en condiciones de humedad, a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Para sobreexpresar las proteínas se llevaron a cabo las transfecciones siguiendo un protocolo utilizando cloruro de calcio para cajas de cultivo de 35mm con células a una confluencia del 60-70% aproximadamente el cual se describe a continuación:

Añadir en orden los siguientes reactivos a un tubo Eppendorf: 1µg de plásmido, 49µl de H₂O bidestilada estéril y 6µl de CaCl₂ 2.5M.

Mezclar por agitación en vórtex.

Agregar en otro tubo Eppendorf 60µl de solución HeBS 2X.

Añadir gota por gota la mezcla DNA/CaCl₂ del primer tubo al segundo tubo que contiene la solución HeBS 2x.

Mezclar vigorosamente y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA).

Mientras tanto cambiar el medio de las cajas de cultivo por DMEM suplementado fresco.

Una vez transcurrido el tiempo agregar uniformemente la mezcla con los precipitados de DNA/CaCl₂ al medio de las cajas de cultivo.

Incubar 24h en condiciones de humedad, a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%.

Reemplazar el medio de las cajas de cultivo por DMEM suplementado fresco.

Incubar nuevamente en condiciones de humedad, a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5% hasta cumplir 72 posteriores al momento de la transfección.

La eficiencia de transfección se estimó visualmente al observando las células en un microscopio de epifluorescencia Nikon utilizando una luz con longitud de onda de 405 nm para excitar la GFP. Además se observaron las células en un microscopio confocal FV10i®Olympus para corroborar la transfección.

Ensayos de FRET para medir la interacción entre las proteínas SIDT1 o SIDT2 y el análogo fluorescente de colesterol DHE.

Para llevar a cabo los experimentos de FRET las células transfectadas fueron incubadas con DHE, para esto se siguieron los pasos descritos a continuación:

Aspirar el DMEM

Lavar dos veces con 1 ml de medio Optimem (*Life Technologies*)

Mezclar el Optimem con la solución de DHE en metanol para una concentración final de 10µM (evitar que la concentración de metanol sea mayor al 1% v/v)

Incubar en condiciones de humedad a 37° y en una atmosfera de CO₂ al 5% por 6h.

Lavar 2 veces con 1 ml de Optimem.

Montar el cubreobjetos en los soportes y mantener en medio de incubación “UNO” para observar en un microscopio confocal Olympus FV10i.

Para realizar las mediciones de FRET se utilizó el método de emisión sensibilizada, para lo cual se tuvieron que adquirir diversas imágenes para cada experimento que se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Características de las imágenes para medir eficiencia de FRET.

Imagen	Características de la imagen
A	Imagen del canal del donador excitando al donador, utilizando sólo el donador.
B	Imagen del canal del aceptor excitando al donador, utilizando sólo el aceptor.
C	Imagen del canal del aceptor excitando al donador, utilizando sólo el aceptor.
D	Imagen del canal del aceptor excitando al aceptor, utilizando sólo el aceptor.
E	Imagen del canal del donador excitando al donador, utilizando donador y aceptor.
F	Imagen del canal del aceptor excitando al donador, utilizando donador y aceptor.
G	Imagen del canal del aceptor excitando al aceptor, utilizando donador y aceptor.

Para la captura de las imágenes se utilizó un microscopio confocal FV10i Olympus (objetivo 60x de inmersión, NA 1.5) utilizando el software Fluoview® utilizando las mismas configuraciones del microscopio.

Se utilizó un filtro azul (ex/em 405-420/450-520) para el donador (DHE) con 20% de intensidad del láser, con sensibilidad de 60% y se utilizó el filtro EGFP (ex/em 488/543) para el aceptor (EGFP-SIDT1 ó EGFP-SIDT2) con 8% de intensidad del láser, una sensibilidad del 50% y

para ambos una apertura confocal de 2.5 y un zoom digital de 3x y el tamaño de la imagen fue 512 x 512 pixeles

Posteriormente a la adquisición de las imágenes se realizó el análisis de estas imágenes utilizando el software Fluoview® versión 1.2 del propio microscopio de acuerdo a los pasos establecidos para la medición de FRET por el método de emisión sensibilizada.

Disminución de la concentración de colesterol en la membrana plasmática utilizando MBCD

Células HEK 293 FT transfectadas con el plásmido EGFP N'-SIDT1 así como también para células transfectadas con EGFP N'-SIDT2 sembradas en cubreobjetos redondos en cajas de 35mm se trataron con Metil- β -ciclodextrina (MBCD) para disminuir la concentración de colesterol presente en la membrana de acuerdo a los pasos siguientes:

Aspirar el DMEM.

Lavar 2 veces las células con Optimen.

Incubar las células en MBCD 1% en Optimen por 90min en condiciones de humedad, a 37°C y en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Lavar dos veces con Optimen y montar el cubreobjetos en el soporte para observar al microscopio, manteniendo las células en medio "UNO".

Se adquirieron imágenes previas al tratamiento y también posteriores al tratamiento utilizando un microscopio confocal FV10i, para el análisis posterior se utilizó el software del mismo equipo así como también el software de análisis de imágenes ImageJ.

Ensayo de viabilidad celular después del tratamiento con MBCD.

Para asegurar que el tratamiento con MBCD no estaba teniendo efectos citotóxicos, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular utilizando el Kit Live-Dead de Invitrogen, siguiendo

las instrucciones del fabricante⁴¹ y observando posteriormente las células en el microscopio confocal.

Colocalización de la señal de EGFP con un marcador de membrana plasmática

Las células que sobreexpresaban SDIT1-EGFP se trataron con MBCD y después se incubaron en presencia del marcador fluorescente rojo específico de membrana, FM4-64 (ex/em 515/640 nm), para adquirir imágenes de cada canal de fluorescencia y posteriormente realizar un análisis de colocalización en la membrana plasmática de ambos fluoróforos.

Relocalización de SDIT1 a la membrana plasmática medida por

El mismo ensayo de incubación con MBCD fue realizado para posteriormente evaluar mediante TIRFM la cantidad de señal correspondiente a la EGFP presente en la membrana plasmática con respecto a las células que no habían sido tratadas con MBCD. Las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus, y utilizando el programa WASABI para adquirir imágenes en planos de TIRF y el análisis para la cuantificación de la señal correspondiente se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ.

Biotinilación de proteínas membranales

La biotinilación de las proteínas de membrana que consiste en la unión covalente de las proteínas que se encuentran expuestas sobre la superficie membranal hacia el exterior con el reactivo NHss el cual reacciona con los grupos amino de las proteínas se llevó a cabo utilizando el “Cell Surface Protein Isolation Kit”(Pierce) siguiendo las instrucciones detalladas del fabricante⁴².

Electrotransferencia (Western blot)

Una vez colectadas las fracciones que contenían las proteínas biotiniladas se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para después llevar a cabo una electrotransferencia (western blot), siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

Preparar un gel de acrilamida al 12%.

Añadir azul de bromofenol a las muestras obtenidas de la biotinilación y hervirlas a 95°C por 3 minutos mientras el gel polimeriza.

Añadir solución amortiguadora para corrida (Tris-glicina) a la cámara y posteriormente cargar las muestras en los pozos.

Correr el gel por 2.5h a 85V.

Para transferir se sumerge en la solución de transferencia húmeda (*Bjerrum Schafer-Nielsen buffer*) las fibras, los papeles filtro y la membrana para llevar a cabo la transferencia húmeda.

Colocar los componentes para llevar a cabo la transferencia, todos deben haber sido humedecidos previamente con la solución para transferencia húmeda (*Bjerrum Schafer-Nielsen buffer*), en el siguiente orden:

- Placa negativa (color negro)
- Fibra
- Papel filtro
- Gel
- Membrana de nitrocelulosa
- Papel filtro
- Fibra
- Placa positiva (transparente)

Correr la transferencia en condiciones frías (4°C) a 120V por 70min.

Una vez obtenida la membrana ésta se bloquea, incubado con albúmina al 5% en TBST 4 horas a temperatura ambiente.

Retirar la solución de bloqueo e incubar con el anticuerpo en TBST con BSA al 1% (w/v) contra GFP policlonal de ratón comercial (CloneTech) y dejar en agitación O/N a 4°C.

Lavar 5 veces con TBST por 5 minutos en cada lavado.

Agregar el anticuerpo secundario 1:5000 en TBST con BSA al 1% (se utilizó un anticuerpo contra ratón comercial de Sigma) y dejar en agitación 1h a TA.

Lavar 5 veces con TBST por 5 minutos cada lavado.

Revelar por quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Femto (Pierce)⁴³ siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizando un equipo Typhoon 9400 (GE, healthcare lifesciences sciences) se obtuvo la imagen digitalizada de la membrana revelada y para posteriormente llevar a cabo un análisis de densitometría utilizando el software imageJ.

FRET en la membrana plasmática

Una vez determinada la relocalización de la proteína EGFP N'-SIDT1 al disminuir la concentración de colesterol membranal utilizando la MBCD. Las células fueron incubadas con el análogo fluorescente de colesterol, DHE, reduciendo el tiempo de incubación a una hora. Esto para evitar la internalización del DHE al citosol y así poder determinar la interacción de éste con la proteínaSIDT1 solamente en la membrana plasmática de las células. El protocolo empleado fue idéntico al utilizado anteriormente para el cálculo de FRET en toda la célula pero disminuyendo el tiempo de incubación a 1 hora.

Tratamiento con MBCD en células sin energía (ATP)

Células transfectadas con el plásmido EGFP N'-SIDT1 fueron sometidas al mismo tratamiento con MBCD para disminuir la concentración de colesterol en la membrana plasmática, pero en este caso la incubación se llevó a cabo en MBCD al 1% (w/v) en medio de incubación "UNO" el cual contiene glucosa pero otras cajas fueron preincubadas con medio "DOS" por media hora el cual a diferencia del anterior contiene desoxi-glucosa en lugar de la glucosa y además se le añadió azida de sodio, esto con el fin de interrumpir la producción de

energía celular, inhibiendo tanto la glucólisis como la cadena respiratoria, para posteriormente cambiar por una mezcla de MBCD al 1% (w/v) en medio “DOS” e incubando las células a 4°C, con el fin de bajar la tasa metabólica interrumpiendo así cualquier tipo de transporte celular en el que sea requerido ATP.

Inhibición de componentes asociados a citoesqueleto

La relocalización de la proteína a la membrana plasmática que tiene efecto por la disminución de colesterol membranal, se evaluó la dependencia con los componentes de citoesqueleto, para esto se llevaron a cabo incubaciones independientes con fármacos específicos para el bloqueo descritos en la Tabla 5.2.

Posterior al tratamiento con el fármaco las células fueron incubadas con 1% de MBCD en Optimen cada uno con la misma concentración del fármaco para asegurar que el fármaco continuara su durante 90min.

Posteriormente se adquirieron imágenes utilizando un microscopio confocal FV10i para evaluar la relocalización de la señal correspondiente a la proteína EGFP N'-SDIT1.

Ensayo de colocalización con Cherry-Clatrina

Las célula fueron cotransfectadas con los plásmidos EGFPN'-SIDT1 y Cherry-Clatrina para evaluar la colocalización previamente al proceso de relocalización de la proteína SIDT1 hacia la membrana plasmática.

Para este ensayo se siguieron los mismos pasos descritos para disminuir la concentración de colesterol membranal y posteriormente se adquirieron imágenes utilizando un microscopio confocal Olympus FV10i® en las células que fueron sometidas al tratamiento y comparándolas con imágenes adquiridas de células que no fueron tratadas. Después se llevó a cabo el análisis de imágenes utilizando tanto el software del microscopio así como también el software ImageJ.

Tabla 5.2 Fármacos utilizados para evaluar la dependencia de la relocalización de SIDT1 a la membrana celular.

Fármaco	Efecto	Condiciones utilizadas
Brefeldina A	Interfiere con el transporte anterógrado del ER a Golgi mediante la inhibición de ARF	50 µg/ml por 20 horas
Citocalasina D	Inhibe la polimerización de los filamentos de actina	5 µg/ml por 2 horas
Nocodazol	Inhibe la polimerización de los microtúbulos	30 µM por 3 horas
Dynasore	Inhibidor competitivo del GTP en la dinamina 1 y 2	0.2 µM por 1 hora

FRET EGFPN'-SIDT1 y Cherry-Clatrina

Para evaluar una posible interacción entre la clatrina y SIDT1, posteriormente a los ensayos de colocalización se utilizó la configuración para medir FRET con los mismos parámetros establecidos anteriormente para estas mediciones. En esta ocasión la molécula utilizada como donador fue la proteína EGFPN'-SIDT1 y la molécula que se utilizó como el aceptor fue la mCherry-Clatrina. Se utilizó igualmente el método de emisión sensibilizada tomando la misma serie de imágenes correspondientes para el aceptor y el donador descritas en la Tabla 5.2, utilizando un microscopio confocal Olympus FV10i® y llevando a cabo el análisis de imágenes en el software del mismo.

6. Resultados

SOBREEXPRESIÓN TRANSITORIA DE LAS PROTEÍNAS FUSIÓN SIDT1-EGFP O SDIT2-EGFP

Células HEK 293 FT fueron transfectadas para que sobreexpresaran transitoriamente las proteínas SIDT1-EGFP o SIDT2-EGFP. Para corroborar la transfección se observaron en un microscopio confocal FV10i y se adquirieron imágenes de las células transfectadas utilizando el filtro para EGFP que se identificaron por la presencia de señal fluorescente característica de la GFP en la región citoplasmática de la célula tal como se muestra en las imágenes representativas a continuación.

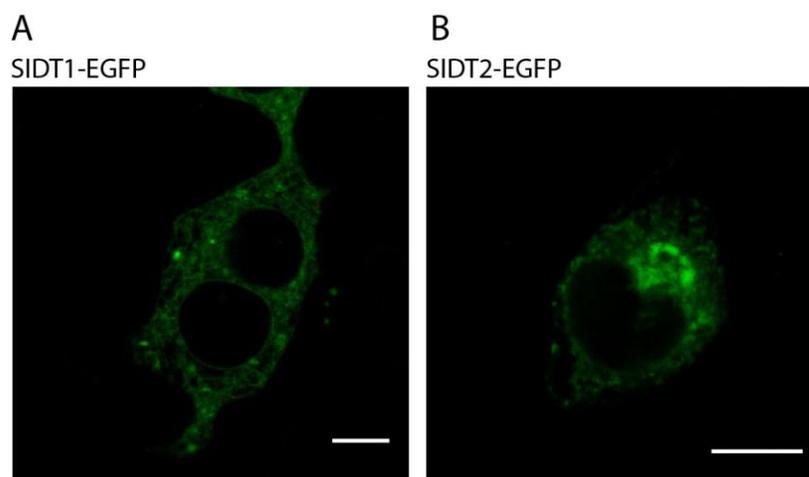


Figura 6.1 sobreexpresión de las proteínas SDIT1 o SIDT2. Imágenes representativas de células HEK 293 FT transfectadas para la sobreexpresión transitoria de: A) SDIT1-EGFP. B) SDIT2-EGFP. La señal verde corresponde a la fluorescencia de la GFP presente en el citoplasma de la célula. Barra de escala: 10 μ m.

INTERACCIÓN DIRECTA ENTRE SDIT1 Y COLESTEROL

Células que sobreexpresaban las proteínas SDIT1-EGFP o SDIT2-EGFP se utilizaron para llevar a cabo ensayos de FRET mediante el método de emisión sensibilizada para medir la interacción entre las proteínas y el DHE, que es un análogo fluorescente de colesterol.

FRET (por sus siglas en inglés *F*öster/*F*luorescence *R*esonance *E*nergy *T*ransfer) es una técnica en microscopía que se basa en el principio de la transferencia de energía no radiativa, que se da cuando los espectros de emisión y excitación de dos fluoróforos diferentes se sobrelapan. La transferencia de energía se lleva a cabo desde un fluoróforo excitado que actúa

como donador hacia otro fluoróforo que actúa como aceptor mediante una interacción de dipolos que únicamente puede ocurrir en un radio de distancia entre 1 y 10nm^{44,45}. En este caso se utilizó al DHE como donador y a la EGFP como aceptor. El método de emisión sensibilizada fue el utilizado para determinar la eficiencia de FRET^{44,46} y así establecer que existe una interacción entre el DHE y las proteínas.

Así mismo debido al porcentaje de identidad que presentan las proteínas SDIT1 y SDIT2 con respecto a la proteína ChUP-1 de *C. elegans* y la presencia de los dominios CRAC conservados en la secuencia de sus aminoácidos se llevaron a cabo mutaciones puntuales en dichos sitios. Las mutaciones consistieron en reemplazar la tirosina central de cada dominio CRAC por una glicina provocando la interrupción de la interacción entre la proteína y el colesterol^{31,38}.

Para cada una de las proteínas se obtuvieron tres mutantes distintas: en una tirosina perteneciente a una región extracelular (designada como SDIT1 ex), en una tirosina que se encuentra dentro de uno de los cruces transmembranales (SDIT1 tr) y una que contenía ambas tirosinas mutadas (SDIT1 dm).

Una vez obtenidas las mutantes se llevaron a cabo los ensayos para calcular la eficiencia de FRET mediante emisión sensibilizada para cada una y así determinar la funcionalidad de la tirosina de cada dominio CRAC en la interacción de la proteína y el colesterol.

Para la proteína SIDT1 nativa (SIDT1 wt) se obtuvo una eficiencia de FRET del 10% lo que indica que hay una interacción directa entre la proteína y el DHE (Figura 6.2 A). No siendo así para la doble mutante (SDIT1-EGFP dm) puesto que la eficiencia de FRET obtenida disminuyó hasta un 1.5% lo cual indica que los dominios CRAC son funcionales por establecer la interacción entre la proteína y el colesterol (Figura 6.2 B).

Para evaluar cada uno de los dominios CRAC de manera individual se realizó el cálculo de la eficiencia de FRET utilizando individualmente células que sobreexpresaban una de las mutantes obtenidas anteriormente. Al utilizarse la proteína mutante en la tirosina del cruce transmembranal (SIDT1 tr) el valor obtenido de la eficiencia de FRET fue de 1% muy semejante

al valor correspondiente al cálculo de la proteína doble mutante (Figura 6.2 C), dejando ver que este dominio CRAC es esencial para la interacción de SIDT1 con el colesterol. Se evaluó igualmente a la proteína mutada en la tirosina de la región extracelular (Figura 6.2 D) cuya eficiencia de FRET obtenida fue de 8% sin ser significativamente diferente a la proteína nativa.

Gracias a los porcentajes de la eficiencia de FRET obtenidas (Figura 6.2 E) para cada una de las mutantes de SIDT1 pudimos identificar que existe un dominio CRAC que se encuentra dentro de un cruce transmembranal de la proteína SIDT1 que es el responsable de la interacción entre ésta y el colesterol dentro de las células.

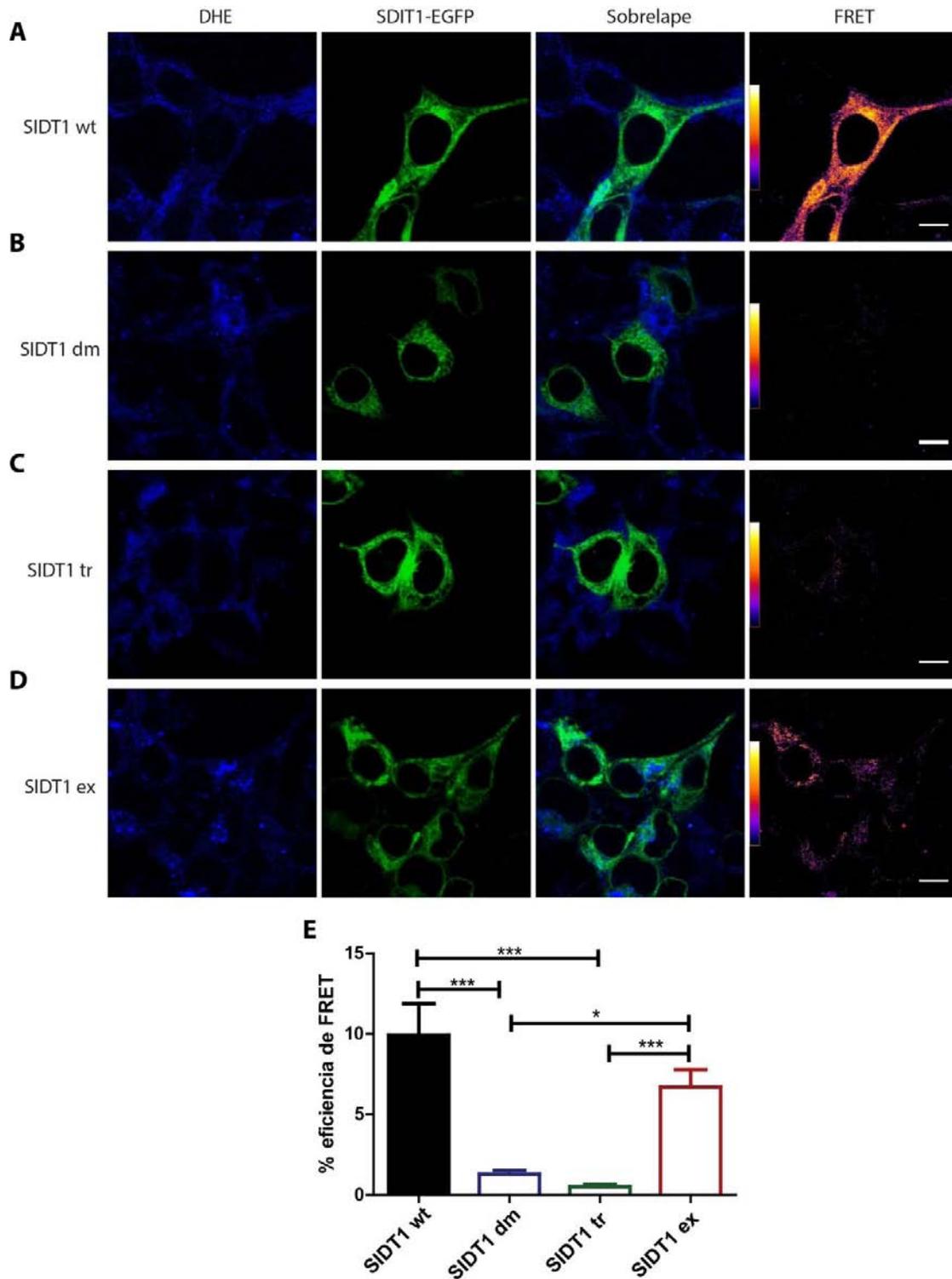


Figura 6.2 SIDT1 interacciona con colesterol. Células HEK 293 FT que sobreexpresaban la proteína fusionada con GFP fueron incubadas con DHE por 6 horas. Se adquirieron las imágenes correspondientes a cada canal para calcular la eficiencia de FRET mediante emisión sensibilizada. A) SIDT1 nativa (wt). B) SIDT1 doble mutante (dm). C) SIDT1 mutada en la tirosina dentro del segmento transmembranal (tr). D) SIDT1 mutada en la tirosina de la región extracelular (ex). E) Gráfica de las eficiencias de FRET calculadas para cada proteína. Barra de escala: 10 μ m; barras de error: error estándar; $n > 30$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

INTERACCIÓN DIRECTA ENTRE SDIT2 Y COLESTEROL

Para las células que sobreexpresaban transitoriamente la proteína SDIT2-EGFP se llevó a cabo el proceso de mutagénesis en las tirosina de los dominios CRAC conservados al igual que para la proteína SIDT1. Después se realizaron ensayos para medir la eficiencia de FRET por emisión sensibilizada, sin embargo, no fue posible obtener datos de valores que mostraran una interacción entre SIDT2-EGFP y el DHE. Por lo tanto se descartó la posibilidad de que la proteína SDIT2 pudiera estar involucrada en el transporte de colesterol en las células.

PREDICCIÓN DE UN MODELO PARA LA PROTEÍNA SIDT1.

Se realizó una predicción de un modelo en 3D para la proteína SIDT1 con el fin de identificar las regiones que comprenden los dominios CRAC. Esta predicción se llevó a cabo utilizando distintos servidores en línea para determinar la topología de la proteína⁴⁷⁻⁴⁹. Utilizando el servidor RaptorX⁵⁰ se obtuvo el modelo en tres dimensiones para la proteína SIDT1 donde se identificaron tres dominios diferentes dentro de la proteína. El dominio 1 comprende once cruces transmembranales cercanos a la región del carboxilo terminal; mientras que en la porción extracelular de la proteína se identificaron los dominios 2 y 3 más cercanos a la región del carboxilo terminal.

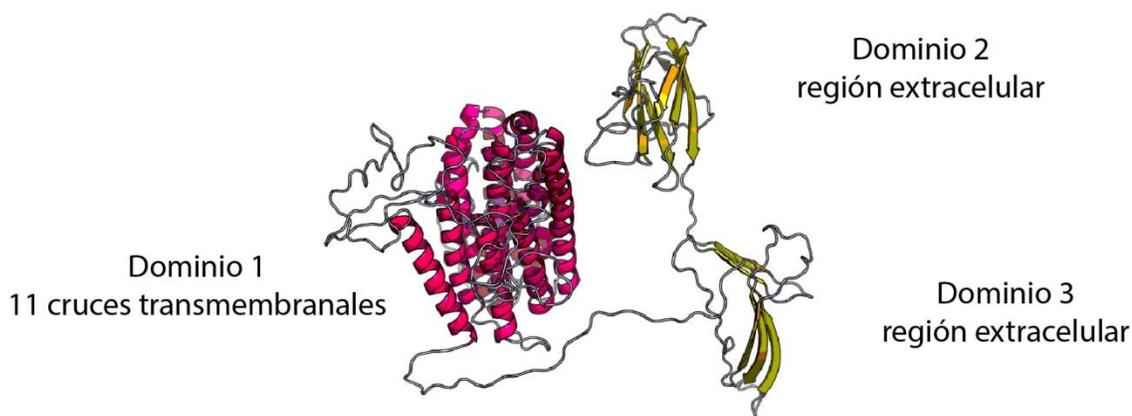


Figura 6.3 Modelo en tres dimensiones de SIDT1. Utilizando el servicios web RaptorX se predijeron tres dominios en la proteína SIDT1. El dominio 1 que comprende los once cruces transmembranales y los dominios 2 y 3 que se encuentran en la región extracelular cercana al amino terminal.

También se realizaron las predicciones de modelos tridimensionales para las proteínas SID1 que como se mencionó antes es un transportador de dsRNA y ChUP-1 que funciona como transportador de colesterol ambas pertenecientes al nematodo *C. elegans* esto únicamente con el fin de comparar la topología predicha para las tres proteínas.

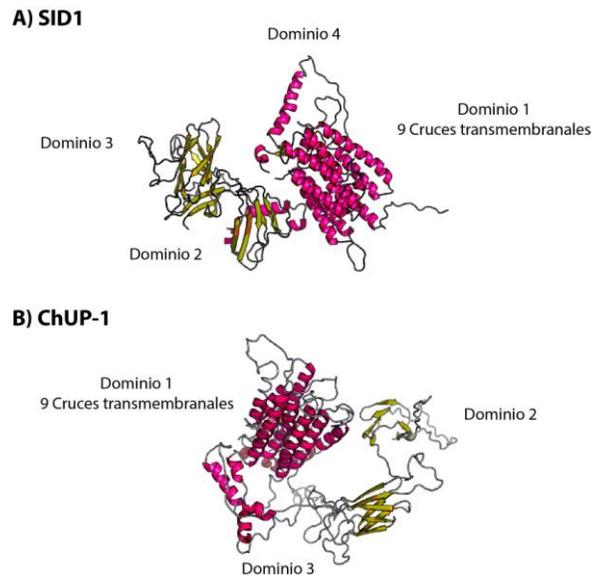


Figura 6.4 Modelo para las proteínas SID1 y ChUP-1. Predicción de los dominios utilizando el servidor web RaptorX para SDI1 de *C. elegans* (A) que consta de cuatro dominios y ChUP-1 (B) que consta de tres dominios.

A partir de los modelos generados, se identificó que, en SIDT1 y ChUP-1 solamente se identificaron tres dominios uno correspondiente a los cruces transmembranales y los otros dos a la región extracelular del amino terminal; a diferencia del modelo predicho para SIDT1 en el cual se identificaron cuatro dominios de los cuales dos contenían los cruces transmembranales y otros dos se encuentran en la región extracelular del carboxilo terminal. Esto representa una evidencia más que podría establecer la homología entre SIDT1 y ChuP1 en su interacción con colesterol.

Otro análisis de la secuencia de SIDT1 realizado *in silico* utilizando el programa TMRPres2D⁴⁷ generó un diagrama representativo de la proteína en dos dimensiones y sus segmentos transmembranales. Así mismo se localizaron las posiciones de los dominios CRAC dentro de la proteína (Figura 6.5).

Se encontró que dentro de la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio CRAC extracelular está contenida también una señal de clasificación a vesículas, la cual está localizada en la porción intracelular de la proteína y está basada en tirosinas⁵¹ (Figura 6.5 A).

Por lo tanto la región del dominio CRAC extracelular y la señal de vesiculación se designó como la tirosina extracelular (ex) para distinguirla de la otra tirosina presente en el segmento transmembranal (tr) del otro dominio CRAC conservado.

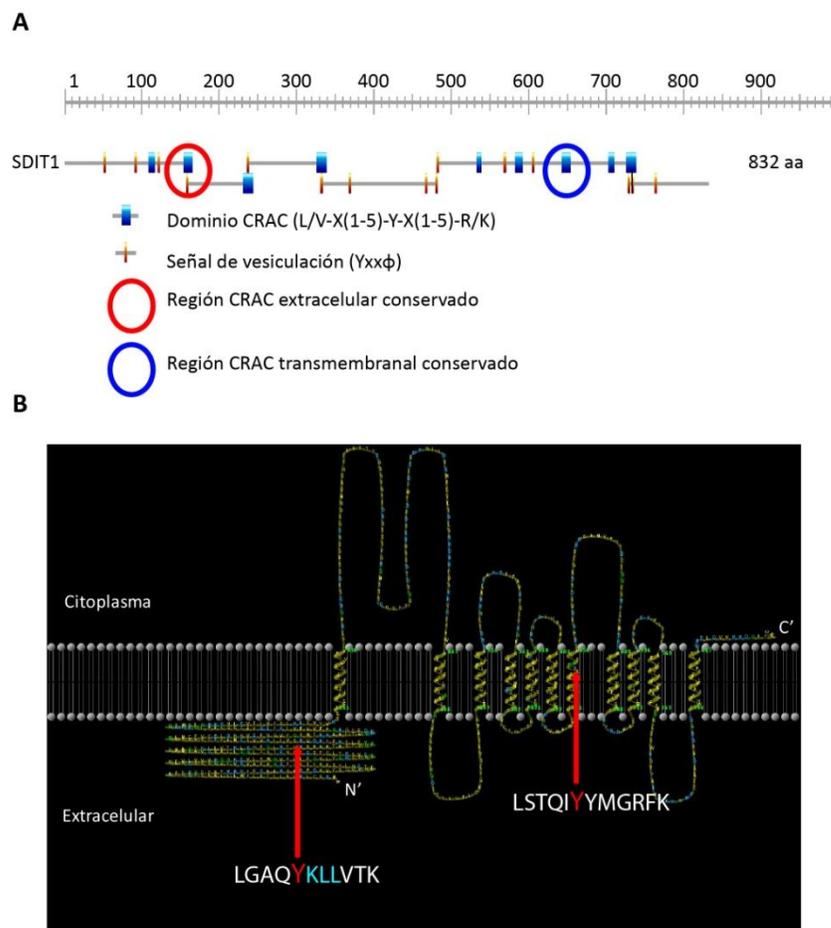


Figura 6.5 Dominios CRAC de la proteína SIDT1. (A) Esquema para ubicar la secuencia del dominio CRAC en la región extracelular de SIDT1, indicado por el círculo rojo, y la secuencia del dominio CRAC transmembranal, señalado por el círculo azul. Nótese que la posición del dominio CRAC extracelular coincide con la posición de una señal de vesiculación. (B) Esquema representativo en dos dimensiones para la topología de SIDT1. Se puede observar como la secuencia del dominio CRAC extracelular contiene la secuencia de vesiculación (letras azules).

Tabla 6.1 Secuencias consenso de señales de vesiculación.

Proteína	Organismo	Secuencia*
LAMP-1	Humano	RKRSHAGYQTI
LAMP-2a	Humano	KHHHAGYEQF
LAMP-2a	Pollo	KKHHNTGYEQF
LAMP-2b	Pollo	RRKSRTGYQSV
LAMP-2c	Pollo	RRKSYAGYQTL
LAMP	<i>Drosophila</i>	RRRSTSRGYMSF
LAMP	Lombriz	RKRSRRGYESV
CD63	Humano	KSIRSGYEVIM
GMP-17	Humano	HCGGPRPGYETL
GMP-17	Ratón	HCRRRAEYETL
CD68	Humano	RRRPSAYQAL
CD1b	Humano	RRRSYQNIP
CD1c	Humano	KKHCSYQDIL
CD1d	Ratón	RRRSAYQDIR
CD1	Rata	RKRRRSYQDIM
Endolyn	Rata	KFCKSKERNYHTL
Endolyn	<i>Drosophila</i>	KFYKARNERNYHTL
TSC403	Humano	KIRLRCQSSGYQRI
TSC403	Ratón	KIRQRHQSSAYQRI
Cystinosin	Humano	HFCLYRKRPGYDQLN
Putative solute carrier	Humano	SLSRGSYKEI
TRP-2	Humano	RRLRKGYTPLMET
HLA-DM	Humano	RRAGHSSYTPLPGS
LmpA	<i>Dictyostellium</i>	KKLRQKQKQGGYQAIINNE
Putative Solute carrier	<i>Dictyostellium</i>	RSKSNQNQSYNLIQL
LIMP-II	<i>Dictyostellium</i>	RKTFYNNNQYNGYNIIN
Transferrin receptor	Humano	PLSYTRFSLA
Asialoglycoprotein receptor	Humano	MTKEYQDLQHL
CI-MPR Human	Humano	SYKYSKVNKE
CD-MPR Human	Humano	PAAYRGGVGD
CTLA-4 Human	Humano	TGVYVKMPPT
Furin Human	Humano	LISYKGLPPE
TGN38	Rata	ASDYQRLNLKL
gp41 HIV-1	HIV	RQGYSPLSFQT
Acid phosphatase	Humano	RMQAQPPGYRHVADGEDHA

*secuencia consenso de vesiculación: Yxxφ; x corresponde a cualquier aminoácido; φ corresponde a L, V, M, F, I.

RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 AL DISMINUIR EL COLESTEROL EN LA MEMBRANA CELULAR

Tomando en cuenta que SIDT1 interacciona con colesterol, se decidió evaluar si la disminución del colesterol en la membrana de las células, tiene algún efecto en las células que sobreexpresan SIDT1-EGFP.

Utilizando metil- β -ciclodextrina (M β CD), un polisacárido cíclico el cual está formado por la unión covalente de cinco azúcares que forman una cavidad hidrofóbica en el centro de la molécula, en la cual se pueden sustraer moléculas de colesterol directamente de la membrana plasmática⁵²⁻⁵⁵, fue posible disminuir la concentración de colesterol membranal.

Una vez disminuido el colesterol de la membrana en las células que sobreexpresaban SDIT1-EGFP se observó, mediante microscopía confocal, que hubo un cambio en la localización subcelular de dicha proteína dado que la señal correspondiente a la GFP aumentó en la membrana plasmática (Figura 6.6A).

Se graficaron los puntos correspondientes a la membrana celular y se compararon las intensidades máximas de fluorescencia. Se obtuvo un aumento del 60% en la intensidad de la fluorescencia en la membrana de las células que habían sido tratadas con M β CD (Figura 6.6 A, gráfica de puntos).

Además se comparó la fluorescencia total correspondiente a la membrana mediante un gráfico de barras, en el cual también se obtuvo un aumento del 60% en la fluorescencia total de la membrana de las células que tenían menos colesterol membranal (Figura 6.6 A, gráfica de barras).

La señal de SDIT1-EGFP cuando se relocaliza coincidió por el solapamiento con la señal para un marcador específico de membrana plasmática (FM4-64), indicando que la relocalización se da de la región citoplasmática de la célula hacia la membrana. (Figura 6.6 B).

Otra aproximación realizada fue utilizando TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*), la cual es un tipo de microscopía en la cual es posible excitar selectivamente sólo los fluoróforos que se encuentran cercanos a la membrana plasmática (una distancia

comprendida entre 50 -200 nm)^{56,57} y así poder comparar la señal de los fluoróforos presentes en ésta región.

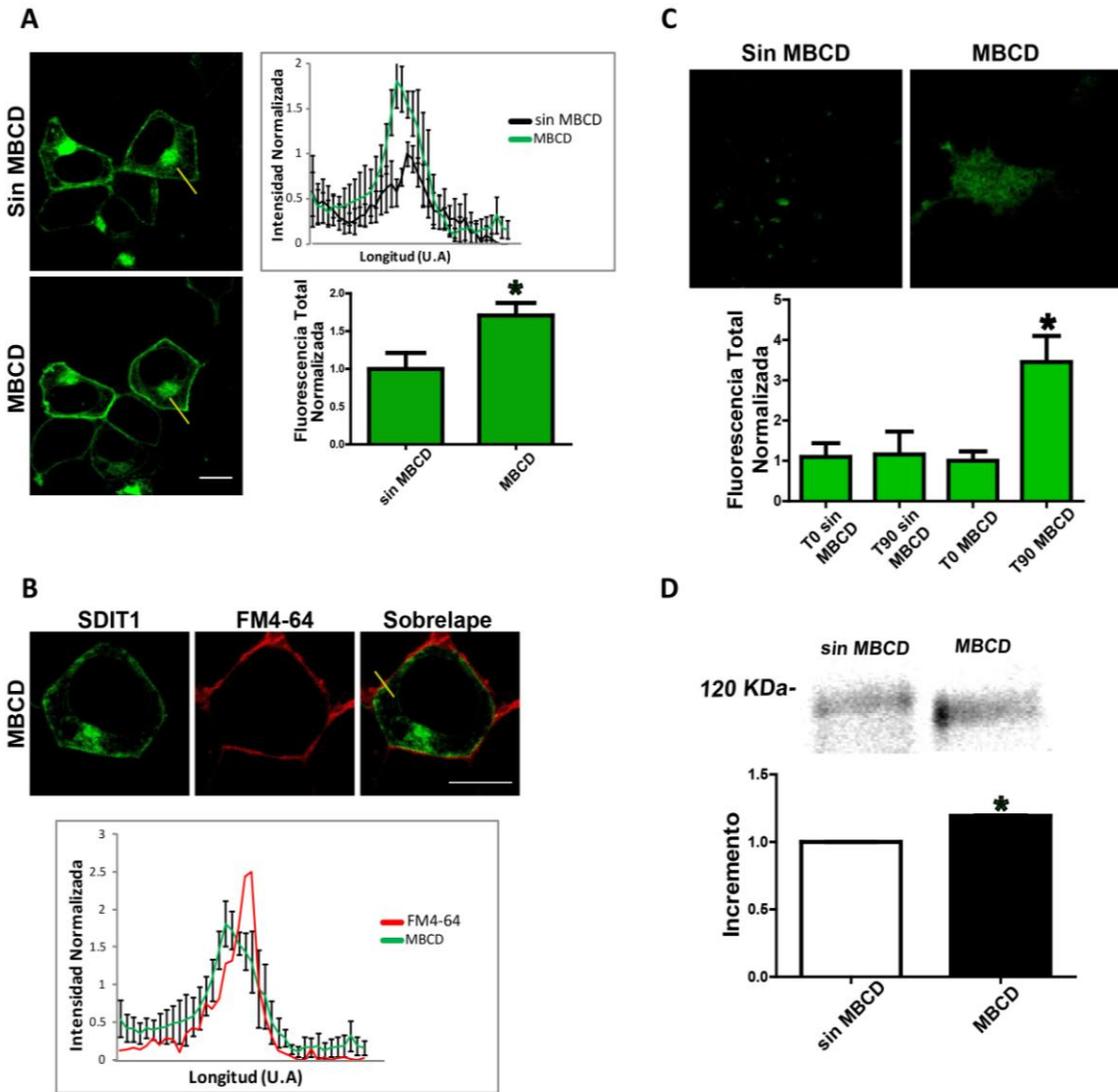


Figura 6.6 Relocalización de la proteína SIDT1 hacia la membrana plasmática. Células HEK 293 FT que sobreexpresaban la proteína SIDT1-EGFP se incubaron con MBCD al 1% (w/v) durante 90 minutos para disminuir su concentración de colesterol en la membrana. (A) Gráfica de puntos que representa la intensidad de fluorescencia a través de la membrana; Gráfica de barras que muestra la fluorescencia total en membrana. Las señales fueron normalizadas con respecto a las células que no fueron tratadas con MBCD. (B) La señal de la proteína posterior al tratamiento colocaliza con la señal del marcador específico de membrana FM4-64. (C) Imágenes representativas de una célula sin tratar con MBCD (izquierda) y una tratada (derecha) en plano de TIRF. Comparación de la fluorescencia en cada una de las condiciones de tratamiento. (D) Western blot para la proteína SIDT1 biotinilada en condición control (sin MBCD) y tratada (MBCD), la gráfica muestra el análisis por densitometría para cada banda. Barras de error: SEM; Barras de escala: 10 μ m; * $p < 0.05$; $n = 3$.

Se adquirieron imágenes mediante TIRFM para células que sobreexpresaban SIDT1-EGFP en cuatro diferentes condiciones: sin añadir MBCD y sin incubar (T0 sin MBCD), sin añadir

MBCD e incubando 90 minutos (T90 sin MBCD), añadiendo MBCD pero sin incubar (T0 MBCD) o añadiendo MBCD e incubando por 90 minutos (T90 MBCD). Se compararon los valores de fluorescencia total en la membrana y se observó un aumento tres veces mayor en la membrana de las células que habían sido tratadas con MBCD por 90 minutos (T90 MBCD) con respecto a las demás condiciones (Figura 6.6 C). Esto nos indica que únicamente al disminuir el colesterol en la membrana plasmática se relocaliza la proteína SDIT1.

Además de los datos anteriores que se obtuvieron mediante microscopía, la relocalización de SIDT1 hacia la membrana plasmática también se comprobó al llevar a cabo una biotilación de las proteínas membranales tanto para células sin tratar como para células tratadas (con menor concentración de colesterol membranar). Una vez aislada la fracción correspondiente a la membrana plasmática se reveló la presencia de SDIT1-EGFP mediante un Western Blot utilizando un anticuerpo contra GFP y se analizó la diferencia de intensidad en las bandas obtenidas por un análisis de densitometría. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre ambas condiciones obteniéndose un valor mayor correspondiente al 20% en las células que fueron tratadas con MBCD con respecto a las que no se trataron (Figura 6.6 D).

RELOCALIZACIÓN DE LAS MUTANTES DE SDIT1 A LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Considerando, los datos obtenidos por los ensayos de FRET en los cuales se determinó que los dominios CRAC conservados en la proteína SIDT1 permiten la interacción con colesterol, además de la presencia de una señal de vesiculación intracelular y habiendo determinado la relocalización de SIDT1 a la membrana al disminuir el colesterol, exploramos la posibilidad de que estas secuencias estuvieran involucradas en la relocalización de la proteína hacia la membrana plasmática.

Para esto se utilizaron células que sobreexpresaban cada una de las mutantes de la proteína fusionada a EGFP obtenidas previamente: mutada en ambas tirosinas (SIDT1 dm), mutada en la tirosina del cruce transmembranar (SDIT1 tr) o mutada en la tirosina de la región extracelular (SIDT1 ex).

El primer análisis se realizó mediante microscopia confocal, se hizo una gráfica de puntos correspondiente a la intensidad de la fluorescencia a través de la membrana y se compararon los valores entre las células sin ningún tratamiento y las tratadas con MBCD (Figura 6.7 A, C, E).

Solamente para las células que sobreexpresaron la proteína mutante en la tirosina del cruce transmembranal (SDIT1 tr) hubo un aumento de tres veces en la intensidad de la fluorescencia membranal (Figura 6.7 C, gráfica de puntos). Para las otras dos mutantes los valores de la intensidad de fluorescencia en la membrana de las células no hubo ningún aumento. (Figura 6.7 A y E, gráficas de puntos).

Además se cuantificó la fluorescencia total de la membrana celular y se graficaron los valores para compararse entre ambas condiciones las células sin tratamiento (sin MBCD) y las que fueron incubadas con MBCD. Al igual que en el análisis anterior, solamente se observó aumento en la fluorescencia de la membrana plasmática en las células que sobreexpresaban SDIT1 tr la cual presentó un incremento de 3 veces en la fluorescencia total de la membrana al tratarse con MBCD (Figura 6.7 C, gráfica de barras), dicho aumento de fluorescencia en la membrana no se observó en las células que sobreexpresaban las otras dos mutantes de SIDT1 (SDIT1 dm y SDIT1 ex) (Figura 6.7 A y E, gráficas de barras).

Los datos obtenidos nos sugieren que la mutación en la tirosina de la región extracelular es responsable de alguna manera de la relocalización de SIDT1 hacia la membrana plasmática, puesto que, cuando esta tirosina está mutada no hay aumento de la señal en membrana.

Una segunda aproximación utilizada para probar que la relocalización de la proteína depende de la tirosina en la región extracelular fue mediante TIRFM. Se utilizaron igualmente las tres mutantes SIDT1 dm, SDIT1 tr y SDIT1 ex (Figura 6.7 B, D, F). Se compararon en cuatro condiciones: sin añadir MBCD y sin incubar (T0 sin MBCD), sin añadir MBCD e incubando 90 minutos (T90 sin MBCD), añadiendo MBCD pero sin incubar (T0 MBCD) o añadiendo MBCD e incubando por 90 minutos (T90 MBCD).

Para la mutante en las dos tirosinas (SDIT1 dm) y para la mutante en la tirosina de la región extracelular no hubo diferencias significativas en la fluorescencia total correspondiente a la membrana de las células (Figura 6.7 B, F). Mientras que para la mutante en la tirosina del cruce transmembranal si se observó que hubo un aumento cuatro veces mayor en la fluorescencia total en la membrana cuando las células fueron tratadas con MBCD (Figura 6.7 D).

Con estos datos se corrobora que la tirosina en la región extracelular es necesaria para permitir la relocalización de SDIT1 hacia la membrana celular cuando se reduce el colesterol membranal.

SDIT1 SE ASOCIA AL COLESTEROL EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Teniendo entonces, por un lado, la interacción entre la proteína con el colesterol y, por el otro, la relocalización de SDIT1 hacia la membrana plasmática al disminuir el colesterol de las células. Se prosiguió a determinar si era posible que la proteína una vez que se encuentra localizada en la membrana plasmática es capaz de interaccionar directamente con colesterol.

Para esto lo primero fue relocalizar la proteína SDIT1 a la membrana plasmática mediante la disminución del colesterol. Posteriormente se incubaron las células con DHE, para calcular la eficiencia de FRET únicamente con la proteína que se encontraba en la membrana plasmática. Esto se llevó a cabo tanto para la proteína nativa como para cada una de las mutantes obtenidas: mutada en ambas tirosinas (SDIT1 dm), mutada en la tirosina del cruce transmembranal (SDIT1 tr) o mutada en la tirosina de la región extracelular (SDIT1 ex).

Al realizar el ensayo para las células que sobreexpresaban la proteína nativa, la señal de FRET se concentró principalmente en la membrana plasmática definiendo el contorno de las células (Figura 6.8 A) y el valor obtenido de eficiencia de FRET en esta región de las células fue del 6% (Figura 6.8 E).

Por otro lado, cuando se realizó este ensayo para las mutantes, la doble mutante (SDIT1 dm) y la mutante en la tirosina de la región transmembranal (SDIT1 tr) no se observó señal en el

canal correspondiente a la señal de FRET (Figura 6.8 B, C), y el valor calculado para eficiencia de FRET fue menor al 1% (Figura 6.8 E).

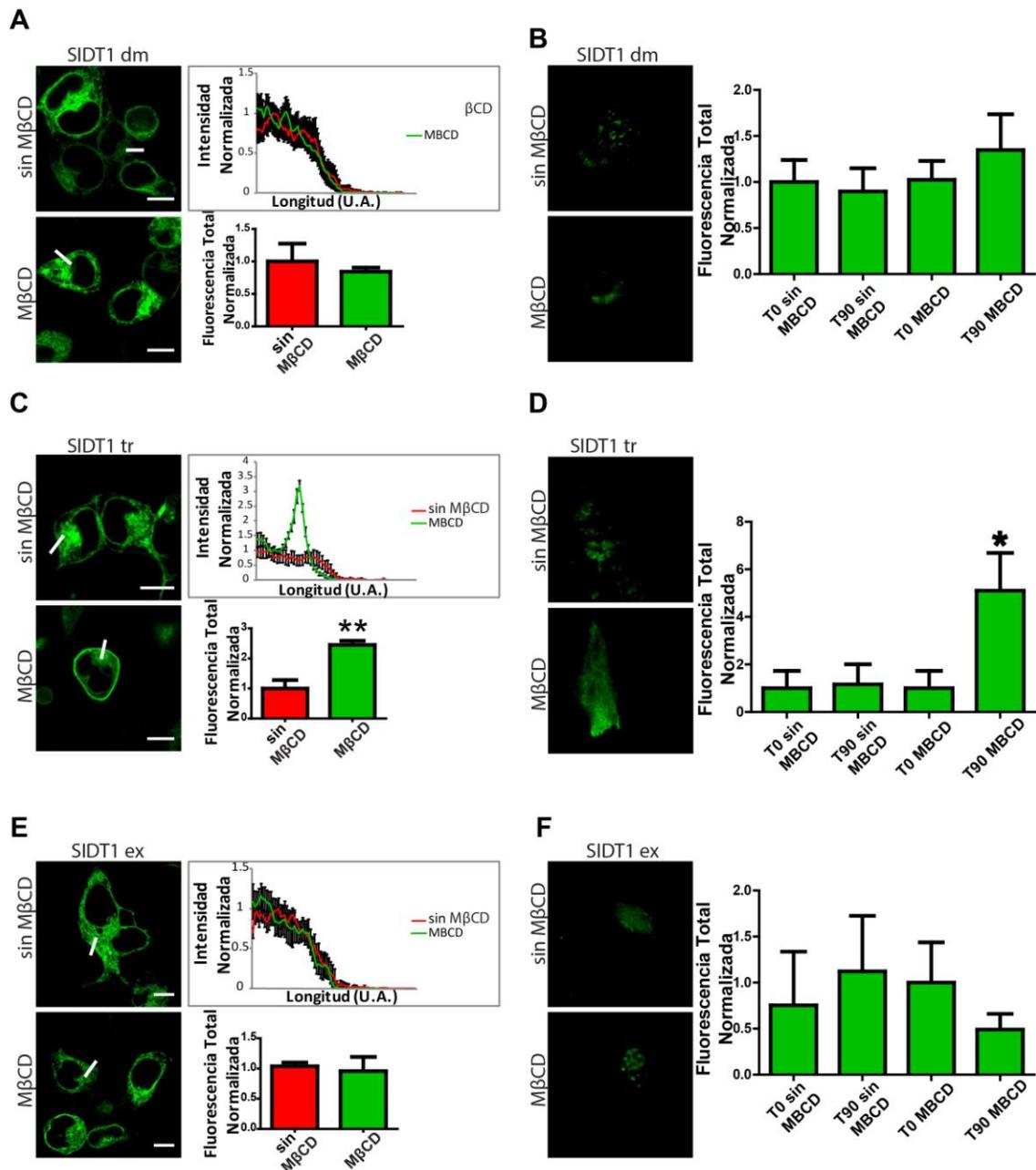


Figura 6.7 Relocalización de las mutantes de SIDT1 hacia la membrana plasmática. Células HEK 293 FT que sobreexpresaban alguna de las mutantes de SDIT1 fueron tratadas con MβCD para disminuir el colesterol membranar. Análisis mediante microscopía confocal de la intensidad de fluorescencia en la membrana, gráfica de puntos o al cuantificar la fluorescencia total, gráfica de barras (A, C, E). Comparación entre la florescencia total cuantificada en la membrana utilizando TIRFM en cada una de las condiciones utilizadas (B, D, F). Barras de error: SEM; * p<0.05; Barra de escala: 10 um.

Sin embargo, a pesar de que en los ensayos realizados utilizando la proteína mutada en la tirosina extracelular (SDIT1 ex) no se observó señal en el canal de FRET en la región membranal si fue posible observar una sutil señal de FRET distribuida al interior de las células (Figura 6.8 D), es decir en el citoplasma y no en la membrana plasmática de la célula. Al hacer el cálculo para la eficiencia de FRET en la membrana plasmática el valor obtenido fue menor que la proteína nativa siendo muy similar a las otras mutantes con un valor del 1% (Figura 6.8 E). Es interesante resaltar que, al interior de la célula comienza a observarse señal de FRET, esto debido a que esta mutante de SIDT1 no se relocaliza a la membrana cuando se disminuye el colesterol, sin embargo es capaz de interactuar con colesterol en la región en la que se localiza.

Así pues SDIT1 es capaz de interactuar con colesterol directamente en la membrana plasmática cuando se relocaliza, a diferencia de las mutantes de dicha proteína que no interactúan con el colesterol debido a que aun siendo capaces de relocalizarse, el dominio CRAC necesario para establecer la interacción ya no es funcional (Figura 6.8 E).

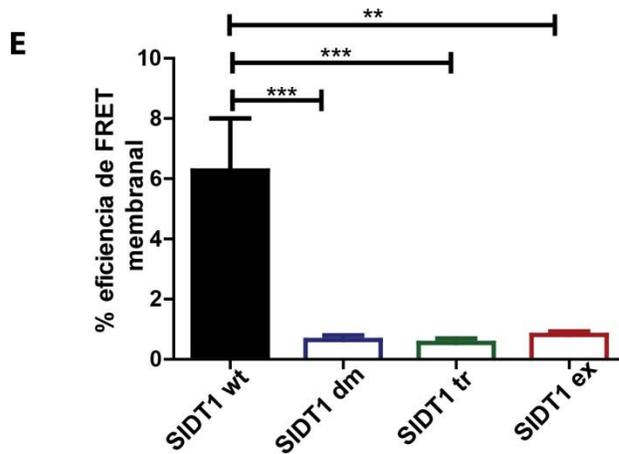
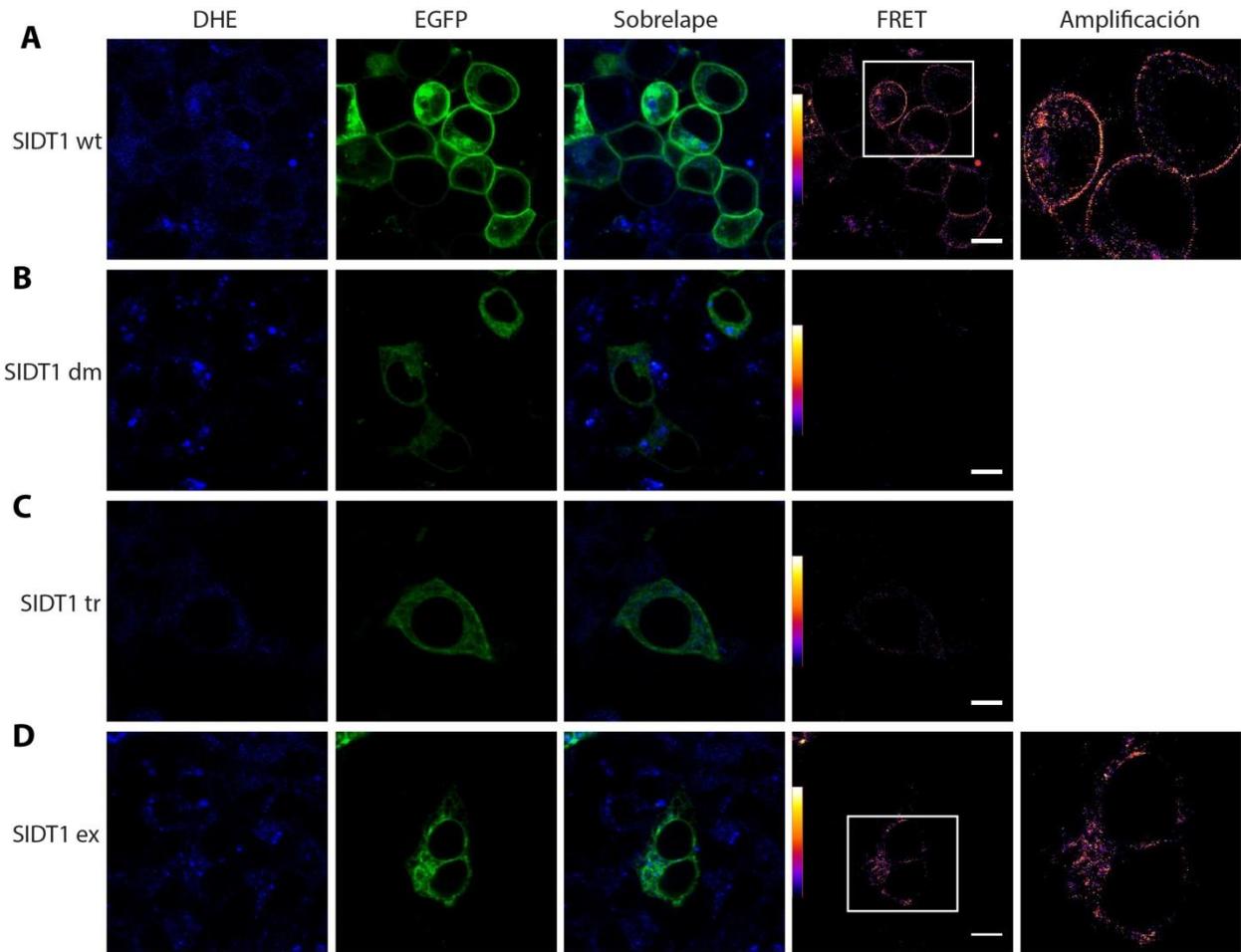


Figura 6.8 SIDT1 interacciona con el colesterol en la membrana plasmática. Células HEK 293 FT que sobreexpresaban la proteína fusionada con GFP fueron tratadas con MBCD por 90 minutos, para provocar la relocalización de la proteína y después se incubaron con DHE. Se adquirieron imágenes correspondientes a cada canal para calcular la eficiencia de FRET por emisión sensibilizada. A) SIDT1 nativa (wt), panel de acercamiento para observar mejor la región membranal con señal de FRET. B) SDIT1 doble mutante (dm). C) SDIT1 mutada en la tirosina dentro del segmento transmembranal (tr). D) SIDT1 mutada en la tirosina de la región extracelular (ex), obsérvese el panel del acercamiento dónde la señal de FRET está distribuido en el citoplasma de la célula. E) Gráfica de las eficiencias de FRET calculadas para cada proteína. Barra de escala: 10 μ m; barras de error: error estándar; $n > 30$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

LA RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 ES DEPENDIENTE DE ENERGÍA.

Ahora bien una vez que se determinó que la relocalización de SIDT1 se produce por la disminución en la concentración de colesterol en la membrana, decidimos evaluar la dependencia energética de éste proceso, es decir si se requiere ATP celular para que la relocalización de SIDT1 se lleve a cabo.

Para esto se probaron dos condiciones diferentes en células que sobreexpresaban SDIT1-EGFP. En la primera condición las células fueron incubadas en solución fisiológica con MBCD en un medio con glucosa disponible. En la segunda las células fueron incubadas en presencia de desoxiglucosa para interrumpir la glucólisis y con azida de sodio para inhibir la cadena respiratoria y así dejar a las células con una menor concentración de ATP disponible para los procesos fisiológicos dependientes de energía. Las células utilizadas como control solo se mantuvieron en la solución fisiológica sin incubarse con MBCD y se compararon los datos obtenidos a continuación.

Primero se adquirieron imágenes por microscopía confocal para cada tratamiento y se compararon (Figura 6.9A). De acuerdo al análisis que se hizo mediante una gráfica de puntos correspondientes a los valores de la intensidad de fluorescencia a través de la membrana (Figura 6.9 B) se determinó que únicamente las células con glucosa fueron capaces de llevar a cabo la relocalización de SDIT1, pues la intensidad de fluorescencia aumento tres veces con respecto a la condición control (sin MBCD) y también en las células que se incubaron con MBCD pero que contenían menos ATP disponible (MBCD –ATP).

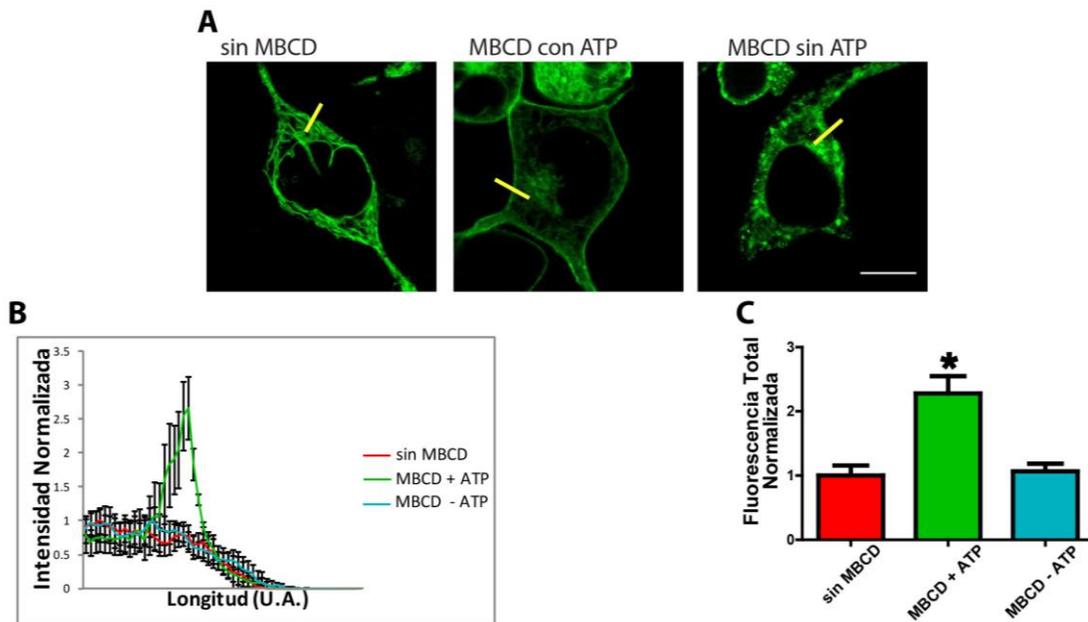


Figura 6.9 La relocalización de SDIT1 a la membrana plasmática depende de la energía celular. (A) Células HEK 293 FT que sobreexpresaban a SDIT1-EGFP control (sin MBCD), tratadas con MBCD (MBCD con ATP) y tratadas con MBCD e incubadas con deoxyglucosa y azida de sodio para disminuir ATP celular (MBCD sin ATP). (B) Gráfica de puntos que representa la intensidad de la señal de la fluorescencia a través de la membrana de las células para cada condición. (C) Comparación gráfica de la fluorescencia total en la membrana de las células para cada condición. Barras de error: SEM; * $p < 0.05$; $n > 30$; Barra de escala: 10 μm .

Igualmente se graficaron los valores de la fluorescencia total en la membrana de las células y se compararon entre sí (Figura 6.9 C). Se determinó que hubo un aumento en la fluorescencia total de la membrana de tres veces únicamente en las células que tenían ATP disponible con respecto a las otras dos condiciones.

En conjunto ambas evidencias muestran que existe un requerimiento de ATP en la célula para llevar a cabo la relocalización de SIDT1 hacia la membrana plasmática cuando se disminuye el colesterol membranal, por lo cual se podría definir como un proceso activo dentro de la célula que es dependiente de energía.

LA RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 NO DEPENDE DE CITOESQUELETO

Como se determinó que la relocalización de SDIT1 depende de que las células contengan ATP disponible, decidimos evaluar varios procesos celulares muy generales que dependen de ATP para llevar a cabo un transporte intracelular de moléculas cargo y determinar si está relocalización depende de alguno de estos mecanismos de transporte intracelular.

Se utilizaron fármacos que interrumpen actividades específicas de las células relacionadas con el citoesqueleto, así como con transporte vesicular para obtener información que pudiera explicar el mecanismo de relocalización de la proteína al reducir la concentración de colesterol en la membrana.

Se utilizó Brefeldina A que, interfiere con la translocación de vesículas provenientes del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi y también promueve que se formen estructuras membranosas a lo largo de los microtúbulos que conectan ambos organelos. Teniendo como resultado el colapso del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para interrumpir finalmente el transporte anterógrado de las proteínas⁵⁸⁻⁶⁰.

Para interrumpir específicamente la polimerización de componentes de citoesqueleto se utilizaron la citocalacina D que interrumpe la polimerización de los filamentos de actina y el nocodazol que tiene acción inhibitoria de la polimerización de los microtúbulos.

Otro fármaco que se utilizó fue el dynasore, que impide la formación de vesículas de clatrina por unirse específicamente con la dinamina.

El tratamiento consistió en incubar las células que sobreexpresaban SDIT1-EGFP con cada fármaco por separado y posteriormente incubarlas con MBCD para reducir las concentraciones de colesterol membranar induciendo la relocalización de la proteína y observar si esta relocalización estaba siendo inhibida por el tratamiento previo del fármaco.

Se adquirieron imágenes por microscopia confocal y se realizó un análisis comparativo de las intensidades de fluorescencia a través de la membrana plasmática en las células tratadas con MBCD respecto a las células en condiciones control (Figura 6.10, gráficas de puntos).

En todos los tratamientos se observó que, después de tratar a las células con MBCD la intensidad de la fluorescencia en la membrana de las células aumento dos veces con respecto a las células que no se le hizo ningún tratamiento (ctrl). Lo cual indica que la acción de los fármacos no interrumpe el proceso de relocalización de SIDT1 hacia la membrana.

Al graficar los valores de la fluorescencia total en membrana para cada uno de los tratamientos y compararlo con la condición control, se obtuvo el mismo aumento significativo en la fluorescencia total en la membrana de las células después de tratarse con MBCD (Figura 6.10, gráficas de barras).

Ambas observaciones nos indican que los tratamientos con cada uno de los fármacos inhibitorios no tienen efecto en la relocalización de la proteína sugiriendo que es un proceso que no depende de citoesqueleto directamente, ni con los procesos de transporte vesicular que fueron afectados con los tratamientos. No es posible establecer un mecanismo claro mediante el cual se dé la relocalización de la proteína SIDT1 al disminuir el colesterol de la membrana plasmática con estos datos.

LA RELOCALIZACIÓN DE SIDT1 COLOCALIZA CON CLATRINA PERO ÉSTAS NO INTERACCIONAN DIRECTAMENTE.

Debido a la presencia de una señal de vesiculación en la secuencia de aminoácidos de la proteína SDIT1 (Figura 6.5) y la ausencia de relocalización de ésta cuando se muta dicho sitio, es posible pensar que la relocalización depende de la formación de vesículas de clatrina. Por tal motivo se llevaron a cabo ensayos de colocalización con clatrina fusionada a la proteína roja fluorescente mCherry.

Estos ensayos se llevaron a cabo en células que sobreexpresaban a SDIT1 fusionada con GFP simultáneamente con la proteína Clatrina-mCherry. Se obtuvieron imágenes de las células para cada canal de las señales correspondientes a los fluoróforos utilizados y se generó un canal de colocalización a partir del cual se calculó un coeficiente de Pearson con valor de 0.64, el cual indica que el porcentaje de colocalización entre ambas proteínas es mayor al 60%.

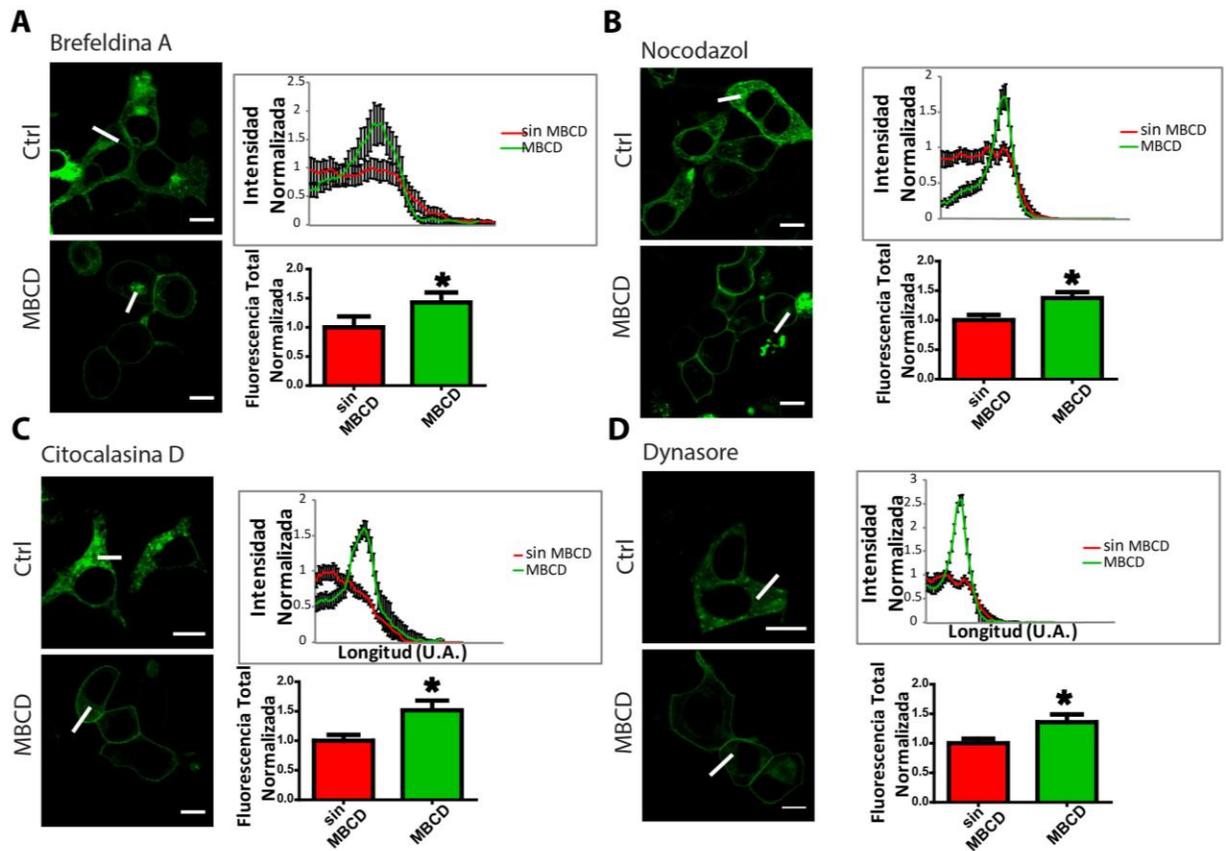


Figura 6.10 La relocalización de SDIT1 a la membrana plasmática es independiente de citoesqueleto. Células HEK 293 FT que sobreexpresaban SDIT1-EGFP control o que fueron tratadas con MBCD para reducir el colesterol en membrana. Previamente se incubaron con fármacos que interrumpen procesos específicos que involucran citoesqueleto: (A) brefeldina A, (B) nocodazol, (C) citocalasina D o (D) dynasore. En las gráficas de puntos se compara la diferencia de las intensidades de la señal a través de la membrana de las células, en las gráficas de barras se comparan la fluorescencia total en la membrana de las células en cada condición. Se normalizó respecto a la señal de las células control. Barras de error: SEM; * $p < 0.05$; $n > 30$; Barras de escala: 10 μm .

Así mismo células que sobreexpresaban simultáneamente ambas proteínas (SDIT1-EGFP y Clatrina-mCherry) fueron tratadas con MBCD para disminuir el colesterol membranal y a partir de las imágenes adquiridas para cada canal de fluorescencia de los fluoróforos se generó un canal de colocalización y se obtuvo el valor del coeficiente de Pearson de 0.67 siendo similar al valor obtenido para las células sin tratamiento de MBCD.

Los datos obtenidos muestran que la colocalización de ambas proteínas se mantiene aun cuando SDIT1 se ha relocalizado a la membrana plasmática, sin embargo, para poder hablar de una interacción directa entre SDIT1 y clatrina era necesario llevar a cabo algún tipo de ensayo que brindara más información al respecto. Por tal motivo se realizaron ensayos de FRET

entre la EGFP y la mCherry, sin embargo no fue posible obtener algún valor de la eficiencia de FRET, lo cual indica que las proteínas no están interaccionando directamente entre ellas a pesar del alto porcentaje de colocalización que éstas presentan.

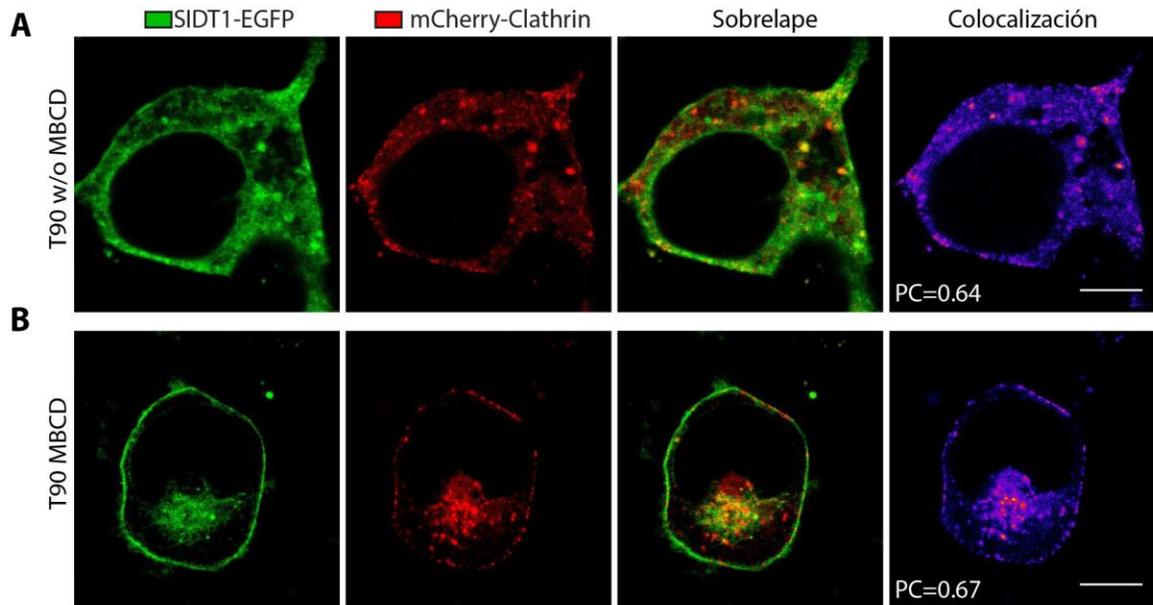


Figura 6.11 SDIT1 colocaliza con clatrina. Células HEK 293 FT transfectadas simultáneamente con SDIT1-EGFP y mCherry-Clatrina. (A) Condiciones control sin tratamiento con MBCD y (B) tratadas con MBCD por 90 minutos para provocar la relocalización de SDIT1 hacia la membrana plasmática. En ambas condiciones las proteínas muestran un porcentaje de colocalización similar. PC: coeficiente de colocalización de Pearson. Barra de escala: 10 μ m.

PREDICCIÓN DE ÁCIDO CÓLICO COMO LIGANDO TEÓRICO DE SDIT1.

Por último se realizó una predicción *in silico* para los posibles sustratos que se unen a la proteína de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. Entre todos los posibles sustratos encontrados interesantemente se predijo la unión con ácido cólico. Este compuesto es un derivado esteroideo del colesterol perteneciente al grupo de las sales biliares que es sintetizado en las células y necesario para la emulsificación y absorción de lípidos en el intestino. Además su estructura molecular es muy semejante a la del colesterol (Figura 6.12 A).

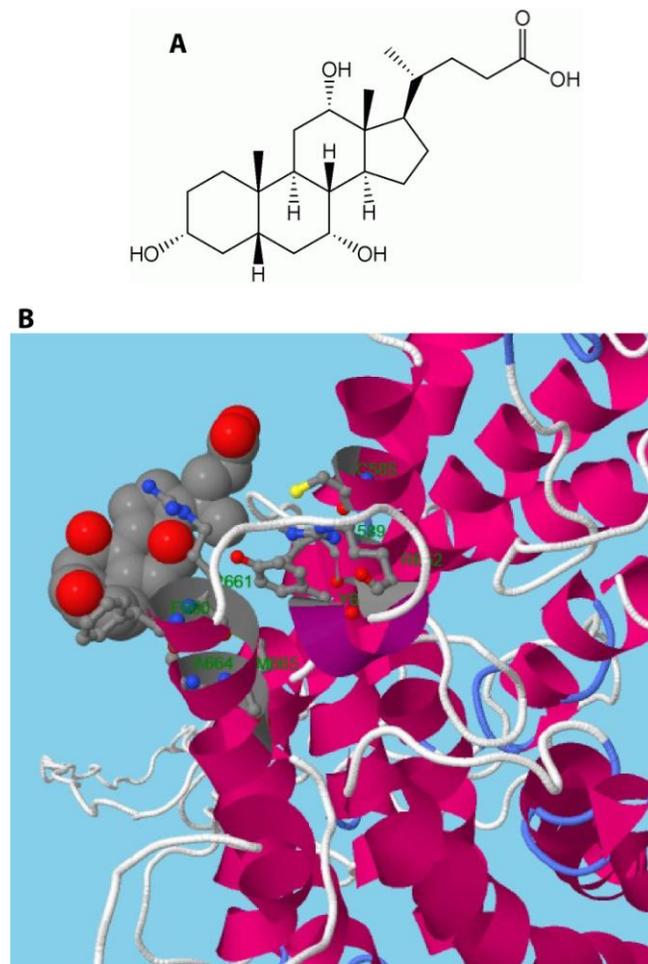


Figura 6.12 Modelo para la unión de SDIT1 con colato. (A) Modelo estructural del ácido cólico. (B) Representación esquemática del sitio de unión predicho de SIDT1 al ácido cólico. Se localizó en el dominio de los cruces transmembranales que incluye los aminoácidos del dominio CRAC transmembranal.

Esta unión entre SDIT1 y el colato además fue predicha en un cruce transmembranal particular de la proteína, el cual abarca los aminoácidos comprendido por el dominio CRAC extracelular, incluida la tirosina central indispensable para la interacción entre ambas moléculas. En conjunto estos datos corroboran la evidencia experimental de la interacción entre la proteína SIDT1 y el colesterol.

7. Discusión

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las proteínas SIDT1 y SIDT2 están involucradas en el transporte intracelular de colesterol. La hipótesis consistía en que ambas proteínas de mamíferos identificadas mediante el análisis *in silico* podrían ser homólogos a la proteína ChUP-1 de *C. elegans* la cual internaliza colesterol a la célula. Utilizando diferentes aproximaciones se determinó la interacción directa entre colesterol celular y la proteína SIDT1 apuntando que la proteína SIDT1 está involucrada en el transporte intracelular de éste.

En el caso de la proteína SIDT2 no se encontró evidencias de esta interacción, además recientemente se reportó que la proteína SIDT2 parece estar involucrada en el proceso de secreción y formación de gránulos de insulina en las células beta-pancreáticas⁶¹. Por lo tanto será necesario más trabajo a futuro para determinar el papel que desempeña SIDT2 dentro de la célula.

La interacción entre el colesterol que se determinó mediante los ensayos de FRET, indican que efectivamente existe un dominio CRAC presente en la proteína que se encuentra localizado en un cruce transmembranal de la proteína, ya que al mutarlo la interacción desaparece pues los valores de eficiencia de FRET decaen súbitamente. Así mismo una vez más se demuestra la importancia de la tirosina central en el dominio de reconocimiento de colesterol ya que es fundamental para que se establezca la interacción tal como se ha reportado anteriormente en otras proteínas como el receptor periférico de benzodiazepina^{31,38} en las que la funcionalidad de las proteínas sigue intacta sin embargo la interacción con el colesterol se pierde, afectando indirectamente la actividad de las proteínas dentro de la célula.

Además mediante microscopía y por biotilación se observó que la proteína responde a la modificación del contenido celular de colesterol principalmente en la membrana plasmática, pues localización de la proteína se modifica del citoplasma a la membrana plasmática, esto podría incluso involucrar un mecanismo de sensor del colesterol presente en la membrana celular^{18,21,25,62,63}, lo cual actualmente se conoce por la función que presenta SREBP1 funcionando como sensor de esteroides para regular la homeostasis lipídica dentro de la

célula^{1,4,14,21,24,30}. Sin embargo será necesario más trabajo para poder esclarecer el mecanismo que interviene en la relocalización de SIDT1 cuando hay una disminución de colesterol.

Por otro lado la segunda tirosina encontrada en la región extracelular de SDIT1 se determinó que en realidad no establecía ninguna interacción directa con colesterol, ya que los valores de FRET no fueron afectados al mutar dicha tirosina, sin embargo fue posible determinar una participación directa cuando la proteína se relocaliza hacia la membrana plasmática lo que sugiere que en realidad sí forma parte de una señal de vesiculación intracelular que es necesaria para que la proteína sea transportada hacia la membrana plasmática tal como ocurre cuando se disminuye el colesterol membranar. Además se obtuvo información acerca de la secuencia de aminoácidos que comprende dicha secuencia para descartar la posibilidad por completo de que se tratara de un dominio CRAC funcional.

Una segunda aproximación indicó también secuencia específica un consenso para ser utilizada como señal de vesiculación ($\Psi\text{xx}\phi$) reconocida por ciertas proteínas tales como: AP-2 y Dab-2⁵¹. Estas secuencias de vesiculación están basadas en tirosinas lo cual podría explicar la pérdida de relocalización cuando se muta la tirosina extracelular de SIDT1. Además recordando la estructura de SDIT1 se debe tomar en cuenta que la presencia de 11 cruces transmembranales le impedirían viajar como una proteína soluble en el citosol, por lo cual la posibilidad de que sea transportado mediante vesículas es mucho más factible.

Estas señales están involucradas en el reclutamiento y la formación de vesículas de clatrina, esto coincide con el patrón de colocalización que presenta SIDT1 y clatrina en los ensayos realizados, sin embargo no hay una interacción directa entre ambas, lo cual se evidencia con la ausencia de FRET al realizar las mediciones entre ambas proteínas, esto deja abierta la posibilidad de explorar otras interacciones directas entre las proteínas adaptadoras de las vesículas de clatrina tal como las mencionadas anteriormente AP-2 y Dab-2.

También tomando en cuenta la predicción que se hizo del ácido cólico como un posible ligando que involucra al sitio CRAC de la proteína, es necesario tomar en cuenta que la proteína podría estar también relacionada con la interacción con otros derivados de colesterol siendo el

cado de las sales biliares y las hormonas esteroideas. Y esto gracias a que se tiene evidencia de qué ambos tipos de moléculas necesitan proteínas específicas para ser internalizadas a la célula y llevar a cabo su función como señales extracelulares a la célula.

La participación de la proteína SIDT1 en los mecanismos de transporte de colesterol depende de su localización subcelular, ya sea en la región citosólica o en la membrana plasmática cuando se relocaliza, esta relocalización es mediada por un mecanismo que es capaz de responder a la disminución de los niveles de colesterol celular y regulada por vesículas de transporte, sin embargo, no está claro aún si SIDT1 funciona a la vez como sensor y efector cuando los niveles de colesterol son bajos.

Una vez en la membrana plasmática, SIDT1 se encargaría de atrapar el colesterol y facilitar su internalización y distribución celular. Esta segunda parte de endocitosis podría involucrar al citoesqueleto celular, esta hipótesis no ha sido explorada en el presente trabajo. Aunque uno esperaría, dada su localización mayoritariamente en retículo endoplásmico con niveles de colesterol normales, que SIDT1 regrese al retículo endoplásmico una vez que se ha unido al colesterol de la membrana. Aunque su papel podría ser también el de simplemente atrapar colesterol del medio extracelular a incorporarlo a la membrana plasmática, y no necesariamente de regresarlo al interior celular.

Cabe mencionar, que en experimentos realizados durante el desarrollo durante este trabajo al incubar a las células con DHE por periodos largos de tiempo, eventualmente se observó FRET entre SIDT1 y DHE en el interior celular. Lo anterior apunta a la hipótesis de que muy posiblemente el SIDT1 ayude a la internalización de colesterol.

8. Conclusiones

Existe una fuerte señal de FRET entre el sitio CRAC de unión a colesterol en la proteína SIDT1 y el análogo de colesterol fluorescente DHE.

La eliminación de una sola tirosina del sitio consenso CRAC, elimina la señal de FRET entre la proteína SIDT1 y el análogo de colesterol DHE.

La reducción de colesterol en la membrana plasmática induce la translocación de la proteína SIDT1, de un sitio intracelular, hacia la membrana plasmática.

Una vez en la membrana plasmática, la proteína SIDT1 une colesterol.

La relocalización de SIDT1 de un compartimento intracelular (muy posiblemente el retículo endoplásmico) hacia la membrana plasmática no depende de un citoesqueleto celular intacto, pero sí de energía. La reducción de ATP intracelular previene la relocalización de SIDT1.

De manera interesante, no se observó señal de FRET entre SIDT2 y DHE, lo que sugiere que esta proteína no interactúa con colesterol. El papel funcional de SIDT2 se desconoce a la fecha.

El papel preciso de esta nueva familia, en comparación con proteínas clásicas involucradas en el transporte de colesterol celular, como las LDL y HDL, aun sigue sin conocerse. Igualmente interesante y en vías de ser explorado con mayor detalle, es el fenómeno de relocalización de SIDT1 en respuesta a la reducción de colesterol en la membrana plasmática. Esta relocalización se da mediante un proceso que requiere de energía celular, pero no del citoesqueleto. El mecanismo molecular exacto podría ser muy complejo e involucrar varias proteínas accesorias, entre ellas podría estar SIDT2.

Todos los datos mencionados arriba apuntan a que SIDT1 sea parte de una nueva familia de proteínas involucradas en el transporte de colesterol en células de mamífero particularmente en humano.

9. Perspectivas

Corroborar mediante ensayos de entrecruzamiento con colesterol fotorreactivo la interacción directa entre éste y la proteína SIDT1.

Utilización de RNAi para clatrina y determinar el efecto que hay sobre la relocalización de SDT1 al reducir la cantidad de colesterol en la membrana.

Evaluar del efecto del fármaco Exo1 (inhibe específicamente la formación de vesículas de clatrina involucradas en procesos de exocitosis) sobre la relocalización de SIDT1 posterior a reducir el colesterol de la membrana plasmática.

Determinar la especificidad de la proteína SIDT1 en su interacción con colesterol, utilizando otro tipo de moléculas con estructuras derivadas del colesterol, tal como el ácido cólico u hormonas esteroideas.

Evaluar la internalización de colesterol mediada por SDIT1, al sobreexpresar la proteína en algún modelo bacteriano, o inclusive intentar rescatar la viabilidad de los nematodos que contienen la mutación para ChUP-1.

Evaluar la interacción de SDIT1 con otros derivados de colesterol, tal sería el caso de sales biliares como colato o directamente sobre hormonas esteroideas.

10. Referencias

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. & Raff, M. *Molecular biology of the cell*. (2007).
2. Du, X. & Yang, H. Endosomal cholesterol trafficking: protein factors at a glance. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 1–7 (2013). doi:10.1093/abbs/gms095. Endosomal
3. Víctor Julián Valdés Rodríguez. CHUP-1: una nueva proteína involucrada en el transporte de colesterol. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2012).
4. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 125–38 (2008).
5. Jafurulla, M., Tiwari, S. & Chattopadhyay, A. Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 569–73 (2011).
6. Campbell, M. K. & Farrell, S. O. *Bioquímica*. 884 (Cengage Learning Editores, 2006).
7. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry. Biological Membranes 4th editio*, 1158 (W. H. Freeman, 2008).
8. Jafurulla, M., Tiwari, S. & Chattopadhyay, A. Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 569–73 (2011).
9. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
10. Ikonen, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 470–477 (2001). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067400002386>>
11. Kidambi, S. & Patel, S. B. Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters: ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. *Xenobiotica*. **38**, 1119–39 (2008).
12. Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–32 (2004).
13. Schmid, S. L. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 511–48 (1997).
14. Brown, J. M. & Yu, L. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*. **51**, (Springer Netherlands, 2010).

15. Ge, L. *et al.* Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 551–6 (2011).
16. Bosner, M. S. *et al.* Assessment of percent cholesterol absorption in humans with stable isotopes. *J. Lipid Res.* **34**, 1047–53 (1993).
17. Altmann, S. W. *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201–4 (2004).
18. Betters, J. L. & Yu, L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett.* **584**, 2740–7 (2010).
19. Klett, E. L. & Patel, S. B. Biomedicine. Will the real cholesterol transporter please stand up. *Science* **303**, 1149–50 (2004).
20. Davies, J. P., Chen, F. W. & Ioannou, Y. a. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* **290**, 2295–8 (2000).
21. Baldán, A., Bojanic, D. D. & Edwards, P. a. The ABCs of sterol transport. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S80–5 (2009).
22. Wang, D. Q.-H. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 221–48 (2007).
23. Wüstner, D. & Maxfield, F. R. Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* 891–898 (2002). doi:10.1172/JCI200216500
24. Mesmin, B. & Maxfield, F. R. Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 636–45 (2009).
25. Prinz, W. a. Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog. Lipid Res.* **46**, 297–314 (2007).
26. Hao, M. *et al.* Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J. Biol. Chem.* **277**, 609–17 (2002).
27. Langhorst, M. F., Reuter, a & Stuermer, C. a O. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2228–40 (2005).
28. Otto, G. P. & Nichols, B. J. The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *J. Cell Sci.* **124**, 3933–40 (2011).
29. Payne, C. K., Jones, S. a, Chen, C. & Zhuang, X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* **8**, 389–401 (2007).

30. Hua, X., Yokoyama, C. & Wu, J. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. ...* **90**, 11603–11607 (1993).
31. Jamin, N. *et al.* Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol. Endocrinol.* **19**, 588–94 (2005).
32. Valdes, V. J., Athie, A., Salinas, L. S., Navarro, R. E. & Vaca, L. CUP-1 Is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **7**, e33962 (2012).
33. Wang, P. *et al.* Imaging Lipid Metabolism in Live *Caenorhabditis elegans* Using Fingerprint Vibrations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 11787–92 (2014).
34. Fantini, J. & Barrantes, F. J. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4**, 31 (2013).
35. Farrand, A. J., LaChapelle, S., Hotze, E. M., Johnson, A. E. & Tweten, R. K. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4341–6 (2010).
36. Duxbury, M. S., Ashley, S. W. & Whang, E. E. RNA interference: a mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 459–63 (2005).
37. Feinberg, E. H. & Hunter, C. P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**, 1545–7 (2003).
38. Li, H. & Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* **139**, 4991–7 (1998).
39. Stratagene Mutagenesis Kit. at <<http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/Stratagene-QuikchangeManual.pdf>>
40. Hall, T. BioEdit. at <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>
41. LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*. at <<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>>
42. Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit. at <<https://www.piercenet.com/instructions/2161511.pdf>>

43. SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate. at <www.piercenet.com/instructions/2160738.pdf>
44. *Imaging Cellular and Molecular Biological Functions*. (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-71331-9
45. Kenworthy, a K. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**, 289–96 (2001).
46. Piston, D. W. & Kremers, G.-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 407–14 (2007).
47. Spyropoulos, I. C., Liakopoulos, T. D., Bagos, P. G. & Hamodrakas, S. J. TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics* **20**, 3258–60 (2004).
48. Sigrist, C. J. A. *et al.* PROSITE : A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **3**, 265–274 (2002).
49. Käll, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* **35**, W429–32 (2007).
50. Källberg, M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* **7**, 1511–22 (2012).
51. Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447 (2003).
52. Klein, U., Gimpl, G. & Fahrenholz, F. Alteration of the Myometrial Plasma Membrane Cholesterol Content with β -Cyclodextrin Modulates the Binding Affinity of the Oxytocin Receptor. *Biochemistry* **34**, 13784–13793 (1995).
53. Rodal, S. K. *et al.* Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. **10**, 961–974 (1999).
54. Steck, T. L., Ye, J. & Lange, Y. Probing Red Cell Membrane Cholesterol Movement with Cyclodextrin. **83**, 2118–2125 (2002).
55. Peake, K. B. & Vance, J. E. Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Lett.* **584**, 2731–9 (2010).
56. Mattheyses, A. L., Simon, S. M. & Rappoport, J. Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *J. Cell Sci.* **123**, 3621–3628 (2010).

57. Betzig, E. *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
58. Presley, J. F. *et al.* Golgi membrane dynamics. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1617–1626 (1998).
59. Nebenführ, A., Ritzenthaler, C. & Robinson, D. G. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* **130**, 1102–1108 (2002).
60. Sciaky, N. *et al.* Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1137–1155 (1997).
61. Gao, J., Gu, X., Mahuran, D. J., Wang, Z. & Zhang, H. Impaired glucose tolerance in a mouse model of *sidt2* deficiency. *PLoS One* **8**, e66139 (2013).
62. Schneider, R. Intracellular sterol transport in eukaryotes, a connection to mitochondrial function? *Biochimie* **89**, 255–9 (2007).
63. Maxfield, F. R. & Menon, A. K. Intracellular sterol transport and distribution. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 379–85 (2006).