



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**“CUP-1: una nueva proteína involucrada en el
transporte de colesterol”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

VÍCTOR JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ

TUTOR:

DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE

DR. LUIS COVARRUBIAS ROBLES



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Abreviaturas

ABC	ATP-binding cassette transporter
Apo	Apolipoproteína
CRAC	Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus
CUP-1	Cholesterol Uptake Protein-1
DHE	Dehidroergosterol
dsRNA	RNA de doble hebra
RE	Retículo endoplásmico
FRET	Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein Proteína verde fluorescente
HDL	High-Density Lipoprotein Lipoproteína de alta densidad
LDL	Low-Density Lipoprotein Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor LDL
MP	Membrana Plasmática
NBD	22-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-23,24-Bisnor-5-Colen-3 β -Ol
NCR	NPC1 Related gene
NPC1	Niemann-Pick disease, type C1
NPC1L1	Niemann-Pick disease, type C1 Like-1
PDM	Producto de Diferencias de la Media de fluorescencia
R	Coeficiente de colocalización de Manders
RNAi	RNA de interferencia
SR-B1	Scavenger Receptor B1
SIDT	SID-1 Transmembrane family, member
SNC	Sistema Nervioso Central
VLDL	Very-Low-density Lipoprotein Lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE

0. RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 El colesterol	8
1.1.1.- Función en membranas celulares	9
1.1.2.- Bioprecursor	9
1.1.2.1 Sales Biliares y Vitamina D	10
1.1.2.2 Oxiesteroles	10
1.1.2.3 Hormonas Esteroideas	11
1.1.3.-Modificador de proteínas	12
1.2 Síntesis endógena de colesterol	14
1.3 Transporte de colesterol	14
1.3.1 Transporte periférico	16
1.3.2 Transporte Intestinal	19
1.3.3 Transporte en el Cerebro	20
1.4 Dominios de unión a colesterol	20
1.4.1 Dominio Sensor de Esteroles (SSD)	21
1.4.2 Motivo CRAC	21
1.5 El nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
• 1.5.1 Anatomía	23
• 1.5.2 Importancia del colesterol	26
• 1.5.3 Transporte de colesterol en <i>C. elegans</i>	27
2. HIPÓTESIS	30
3. OBJETIVOS	30
4. RESULTADOS	31
• 4.1 Identificación de CUP-1 como una proteína asociada al metabolismo de colesterol.	31
• 4.2 La ausencia de CUP-1 resulta en un decremento de la fertilidad de <i>C. elegans</i> ante la carencia de colesterol en el medio.	33

• 4.3 La ausencia de CUP-1 afecta el crecimiento, la movilidad y la resistencia al estrés de <i>C. elegans</i>	37
• 4.4 La ausencia de CUP-1 repercute en la internalización de colesterol en <i>C. elegans</i>	41
• 4.5 La expresión de CUP-1 concuerda con zonas ricas en colesterol en <i>C. elegans</i>	44
• 4.6 Localización subcelular de CUP-1::GFP en membrana plasmática, RE, endosomas y lisosomas	46
• 4.7 Interacción entre CUP-1::GFP y DHE medida por FRET	49
• 4.8 Las proteínas homólogas SIDT1 y SIDT2 poseen dominios CRAC conservados y no están involucradas en el RNAi	52
• 4.9 Localización subcelular de hSIDT1 y mSIDT2 y su interacción con DHE medida por FRET	55
• 4.10 En <i>Mus musculus</i> , SIDT1 tiene una expresión tejido específica mientras que SIDT2 es ubicuo.	59
5. DISCUSIÓN	62
• 5.1 CUP-1: una nueva proteína esencial en el metabolismo de colesterol en el nematodo <i>C. elegans</i> .	62
• 5.2 CUP-1 esta directamente involucrado con la toma de colesterol dietético en <i>C. elegans</i>	64
• 5.3 La expresión de CUP-1 correlaciona con zonas ricas en colesterol principalmente en el tracto digestivo de <i>C. elegans</i>	65
• 5.4 La localización subcelular de CUP-1, SIDT1 y SIDT2 es compatible con proteínas involucradas en la endocitosis de colesterol	67
• 5.5 CUP-1, SIDT1 y SIDT2 interaccionan directamente con el colesterol	69

• 5.6 El papel de SIDT1 y SIDT2 en mamíferos	71
6. CONCLUSIONES	73
• 6.1 Modelo de Funcionamiento	73
• 6.2 CUP-1: una nueva familia de proteínas involucradas en el metabolismo de colesterol, ¿un nuevo blanco terapéutico?	75
7. PERSPECTIVAS	77
• 7.1 Comprobar experimentalmente que SIDT1 y SIDT2 median el transporte de colesterol	77
• 7.2 Disecar la vía de entrada de colesterol mediada por SIDT1 y/o SIDT2	78
• 7.3 Explorar la selectividad de SIDT1 y SIDT2	79
• 7.4 Importancia del SIDT1 y SIDT2 en ratón.	79
8. MATERIALES Y MÉTODOS	80
9. REFERENCIAS	90
10.- APÉNDICE: Artículo Valdes VJ. et. al. “CUP-1 is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in Caenorhabditis elegans” PLoS One. 2012;7(3):e33962. Epub 2012 Mar 27.	99
[ANEXOS]	100

- ❖ **ANEXO I** – CUP-1 no está involucrado en la sistemicidad del RNAi en *C. elegans*

- ❖ **ANEXO II** – Alineamiento múltiple de Secuencias por ClustalW de CUP-1, SIDT1 y SIDT2. Señales de endocitosis y dominios CRAC conservados.

- ❖ **ANEXO III** – Expresión normalizada de SIDT1 y SIDT2 en tejidos humanos

- ❖ **ANEXO IV** – Tinción de lípidos de animales carentes de CUP-1

- ❖ **ANEXO V** – Motivos CRAC en la proteína NPC1L1 humana.

A mi padre,
por haberme enseñado a emocionarme por la ciencia...

0. Resumen

El colesterol es una molécula con importantes y diversas funciones en una gran cantidad de organismos multicelulares, desde bioprecursor de hormonas esteroideas hasta organizador de la membrana celular. Aunque muchos animales son capaces de biosintetizar colesterol, una importante proporción de éste es obtenido de la dieta al ser absorbido por los enterocitos del intestino delgado por NPC1L1. Adicionalmente se han desarrollado complejos mecanismos para transportar colesterol en el torrente sanguíneo (lipoproteínas, receptores LDL, transportadores ABC, etc.) y garantizar su distribución en todos los tejidos.

En el presente trabajo hemos identificado una nueva proteína involucrada en la absorción de colesterol proveniente de la dieta en el nematodo *Caenorhabditis elegans* a la cual hemos nombrado CUP-1, del inglés “*cholesterol uptake protein 1*”. La ausencia de CUP-1 en los nematodos resulta en una disminución en la internalización de colesterol produciendo animales hipersensibles a la ausencia de éste.

A nivel intracelular detectamos la presencia de CUP-1 en membrana plasmática, endosomas, lisosomas y Golgi además de colocalizar en vesículas ricas en colesterol. Los homólogos de CUP-1 en genomas de mamíferos (SIDT1 y SIDT2) también presentan una localización subcelular similar. Tanto CUP-1 como sus homólogos poseen secuencias de unión a colesterol tipo CRAC cuya interacción con colesterol fluorescente fue demostrada mediante ensayos de transferencia de energía fluorescente (FRET). Adicionalmente, demostramos que la mutagénesis del dominio CRAC transmembranal de CUP-1 tiene un efecto negativo en la interacción con el colesterol fluorescente demostrando así la funcionalidad de dicho dominio.

Por su parte, el análisis de la expresión a nivel de mensajero de los homólogos de CUP-1 en tejidos de ratón mostró que, mientras SIDT2 tiene una alta expresión en el desarrollo y su presencia es detectada en todos los tejidos adultos, SIDT1 tiene una expresión tejido específica enriquecida en SNC e intestino.

En conjunto, estos datos nos llevan a proponer que CUP-1 y sus homólogos podrían estar involucrados en el metabolismo de colesterol en distintos organismos. Dada su baja homología con cualquier otra proteína, suponemos que son los primeros miembros de una nueva familia involucrada en el metabolismo de colesterol.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El colesterol

El colesterol es un lípido esteroide compuesto por cuatro anillos de carbono: tres hexagonales, (denominados “A”, “B” y “C”) y uno pentagonal denominado “D” (Figura 1). Estos cuatro anillos se encuentran fusionados entre sí, confiriéndole al colesterol una estructura rígida y prácticamente plana¹. El colesterol tiene dos radicales metilo en los carbonos 10 y 13 y una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17 aumentando sus propiedades apolares e hidrofóbicas. El colesterol también presenta una insaturación entre los carbonos 5 y 6 y un grupo hidroxilo en el carbono 3 que le otorga ciertas propiedades polares reduciendo un poco su hidrofobicidad.

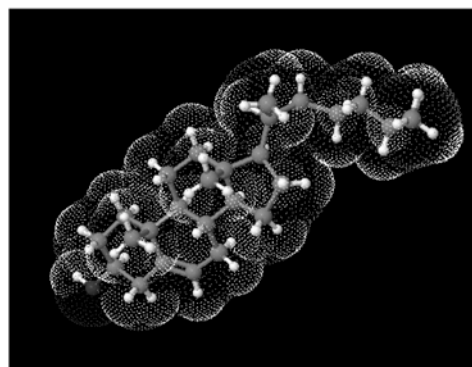
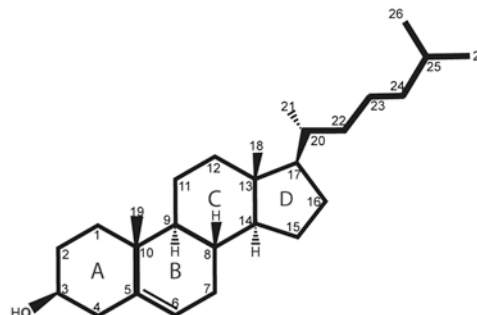


Figura 1. Estructura del Colesterol. En el panel superior se muestran numerados los 27 carbonos de la molécula de colesterol así como los cuatro anillos que lo conforman. En el panel inferior se muestra una representación tridimensional de la molécula mostrando el espacio ocupado por las fuerzas de van der Waals. Modelo generado en Jmol.

El colesterol tiene importantes funciones en organismos eucariontes siendo su presencia absolutamente fundamental para muchos procesos celulares. En general se pueden clasificar en tres categorías que a continuación se describen:

1.1.1 Función en Membranas Celulares

El colesterol es un abundante componente en las membranas celulares de animales vertebrados, puede llegar a constituir hasta el 25% del total de sus lípidos llegando hasta una proporción 1:1 con relación a los fosfolípidos², aunque estos números dependen de la confluencia y el tipo celular. Intracelularmente también se encuentra en las membranas de endosomas y el aparato del Golgi aunque en menor proporción. Por otro lado, en el retículo endoplásmico (RE) apenas constituye el 1% de su membrana y esta ausente en la membrana mitocondrial³. Dada su estructura rígida, el colesterol es capaz de compactar y organizar los fosfolípidos de la membrana al interactuar con las cadenas alifáticas de éstos⁴, el resultado es un aumento del orden de la membrana disminuyendo su fluidez, lo que resulta en una disminución de la movilidad y disfunción de proteínas membranales y en una menor permeabilidad de moléculas polares⁵.

Aunque el colesterol puede difundir en y entre membranas, la distribución del colesterol no es homogénea: existen dominios o zonas de la membrana plasmática (MP) que son aun más ricas en colesterol, como las invaginaciones de caveolina-1 llamadas *caveolas* o las “balsas lipídicas resistentes a detergentes”⁶⁻⁸. En general estas zonas sirven como centros organizadores para moléculas involucradas en la transducción de señales y endocitosis.

1.1.2 Bioprecursor

El colesterol es la base bioquímica para sintetizar una serie de moléculas con importantes funciones biológicas que se describen a continuación.

1.1.2.1 Sales Biliares y Vitamina D

En los hepatocitos el colesterol es oxidado (vía el citocromo P450) a ácido cólico (Figura 2) y quenodesoxicólico, los cuales son modificados, almacenados y luego secretados por la vesícula biliar al lumen del intestino⁹. Las sales biliares ayudan a solubilizar grasas promoviendo la formación de micelas, permitiendo la acción de lipasas y su posterior absorción en las membranas de los enterocitos intestinales. Junto con las sales biliares también se excreta gran cantidad de colesterol, una parte de éste es reabsorbido (junto con las sales biliares) en la membrana del intestino delgado y luego transportado al hígado¹⁰.

Por su parte la vitamina D es sintetizada cuando el 7-dehidrocolesterol (derivado del colesterol) reacciona con luz UV en las células de la piel produciendo colecalciferol¹¹. Este compuesto sufre una serie de modificaciones en el hígado y posteriormente en los riñones antes de convertirse en la forma activa de vitamina D la cual es transportada por el torrente sanguíneo unida a una proteína acarreadora, la cual la lleva a los distintos tejidos blanco. La vitamina D puede funcionar como una citosina involucrada en la respuesta inmune o como un factor de transcripción al ser translocada al núcleo regulando genes involucrados con la homeostasis de calcio y fosforo¹².

1.1.2.2 Oxiesteroles

El colesterol puede ser oxidado a los llamados oxiesteroles¹³ (Figura 2), su síntesis esta mediada por proteínas de la familia del citocromo P450 presentes en la mitocondria y la membrana del RE de prácticamente cualquier célula del organismo. Aunque poco abundantes (1:1000 en proporción con el colesterol), los oxiesteroles tienen funciones relacionadas con la regulación negativa del metabolismo de colesterol inhibiendo su síntesis. Al ser menos hidrofóbicos que el

colesterol, se ha propuesto que pudieran funcionar como lípidos señalizadores e incluso se les ha relacionado con agregación plaquetaria, apoptosis, bloqueo de estrógenos, citotoxicidad y también como mediadores de la inflamación³.

1.1.2.3 Hormonas Esteroideas

El colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroideas¹⁴, la síntesis ocurre en el espacio intermembranoso de la mitocondria mediado por la enzima “*Cholesterol side-chain cleavage enzyme*”, un miembro de la familia del citocromo P450¹⁵. Esta enzima cataliza la conversión del colesterol en pregnenolona, de la cual se derivan todas las hormonas esteroideas (Figura 2). De hecho, todas las hormonas esteroideas comparten los cuatro anillos centrales del colesterol ya que la mayoría de las modificaciones ocurren en la cadena alifática del carbono 17. Los únicos tejidos capaces de sintetizar hormonas esteroideas son las gónadas (masculinas y femeninas), las glándulas adrenales y el cerebro.

Estas hormonas pueden ser agrupadas en cinco grupos por el receptor al que se unen¹⁶: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, y progestágenos. Todas juegan importantes y diversos papeles participando en el control metabólico de carbohidratos, lípidos y proteínas además de mediar la respuesta al estrés, inflamación y regulación inmunológica (ej. cortisol, cortisona y corticosterona). Las hormonas esteroideas también participan en la regulación del equilibrio de electrolitos en sangre (ej. aldosterona), y en el desarrollo de características sexuales masculinas (ej. testosterona y sus derivados) y femeninas (ej. estrógenos y progesterona).

A los derivados de la pregnenolona producidos en el sistema nervioso central (SNC) se les denominan neuroesteroides¹⁷⁻¹⁹, y son un campo relativamente sin explorar, se han relacionado con funciones neuroprotectoras y antagónicas del

receptor GABA_B. También se ha observado que incrementan la mielinización y la neurogénesis en el hipocampo por lo que se cree tienen relación con la memoria y las capacidades cognitivas.

1.1.3.- Modificador de proteínas

El hidroxilo único del colesterol permite la formación de un grupo éster con diferentes compuestos, incluidas algunas proteínas modificando la función y estabilidad de las mismas²⁰⁻²². El caso mejor estudiado es sin duda *Sonic hedgehog* (SH), un morfógeno involucrado en la organogénesis de vertebrados con importantes funciones en la formación de las extremidades y la organización del cerebro^{23,24}. Antes de ser secretado, SH sufre una serie de modificaciones postraduccionales que incluyen la unión covalente de colesterol en el carboxilo terminal de la proteína²⁵, esta unión modifica la secreción, tráfico y transporte de SH en el medio extracelular, pero también la interacción con su receptor Patched-1, quien comparte homología con NPC-1, una proteína capaz de mediar la translocación de lípidos de un lado a otro de membranas²⁶ (ver más adelante).

El colesterol también puede modificar la función de proteínas de membrana al unirse de manera no covalente a dominios de unión a esteroides presentes en éstas. Algunos ejemplos son la podocina, involucrada en uniones intracelulares de células del riñón, o los canales MEC-1 y BK: el primero un canal de Na⁺ involucrado en mecanosensición y el segundo un canal de K⁺ regulado por voltaje^{27,28}.

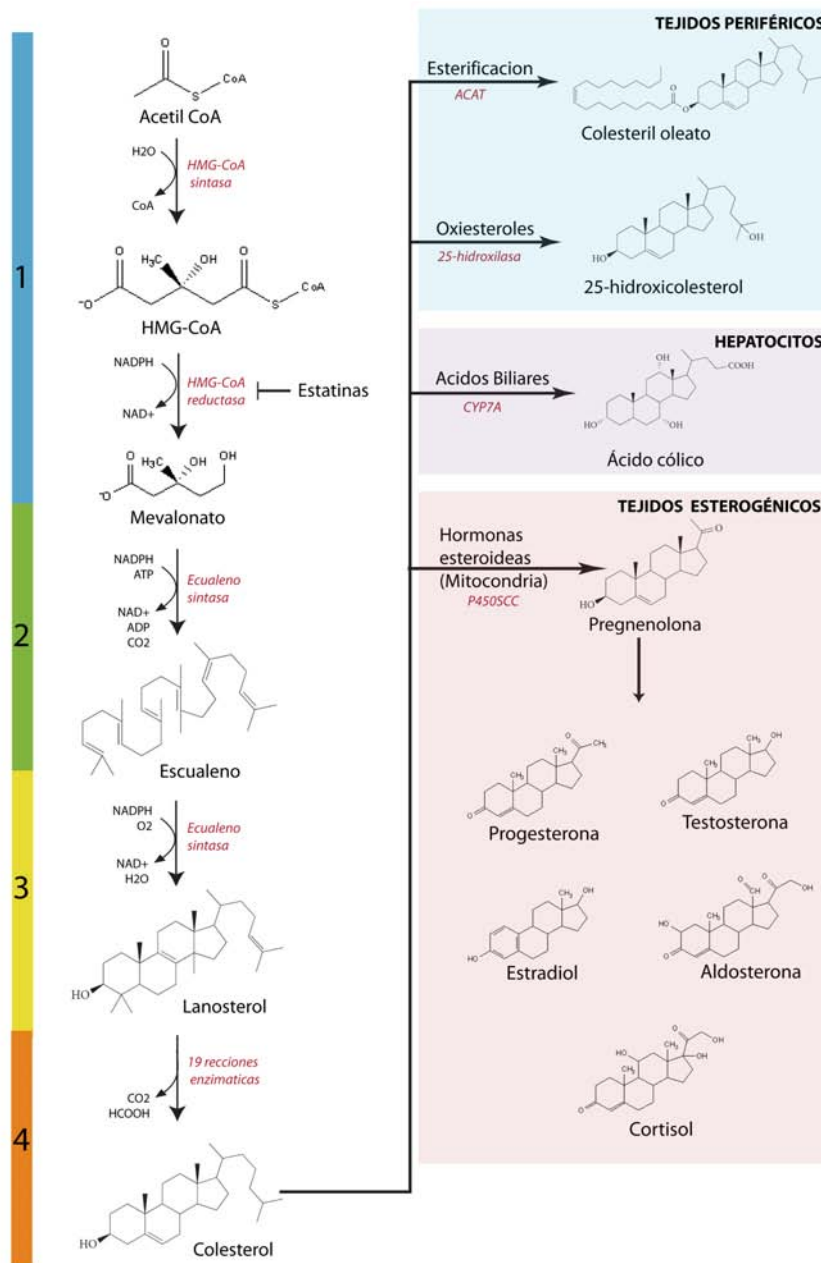


Figura 2. Síntesis y modificaciones de la molécula de colesterol. (1) La síntesis de colesterol comienza fusionando varias moléculas de Acetil coenzima A (CoA) para generar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA el cual es reducido a Mevalonato por la HMG-CoA reductasa. Esta enzima es el paso limitante de la síntesis de colesterol y es inhibida de los fármacos estatinas. (2) Varias moléculas de Mevalonato son descarboxiladas, isomerizadas y fusionadas para generar una molécula de Escualeno. (3) El escualeno es reducido y ciclado mediante la adición de oxígeno generando una molécula de Lanosterol. (4) Finalmente, el lanosterol se convierte en colesterol después de varias reacciones enzimáticas no del todo esclarecidas. Estos pasos son necesarios para eliminar tres grupos metilo: dos en el carbono 4 y uno en el carbono 14. Además, ocurre la reducción de un doble enlace en la cadena lateral y el desplazamiento de un doble enlace a los carbonos 5 y 6. El colesterol puede ser modificado por distintas vías, en la figura se muestran algunos ejemplos de metabolitos de colesterol: en los tejidos periféricos, el colesterol puede ser esterificado u oxidado. En el hígado además puede ser metabolizado a ácido cólico del que derivan las sales biliares. Por su parte, en la mitocondria de tejidos esterogénicos (células de Leydig en los testículos, ovarios y glándulas adrenales) el colesterol es convertido en hormonas esteroideas. En rojo se indican los nombres de algunas enzimas involucrados tanto en la síntesis como en la modificación del colesterol.

1.2 Síntesis endógena de colesterol

La síntesis de colesterol ocurre principalmente en el hígado y en el intestino delgado aunque prácticamente cualquier célula nucleada de animales vertebrados es capaz de biosintetizar esta molécula³. La biosíntesis de colesterol ocurre en la membrana del RE liso en un complejo mecanismo que involucra a más de 30 enzimas para convertir a la acetil coenzima-A en colesterol²⁹ (Figura 2).

Los niveles corporales de colesterol son regulados principalmente en el hígado a través de los receptores X (LXR) que son activados por oxisteroles sanguíneos o por el colesterol presente en la membrana del RE de los hepatocitos³⁰. La activación de estos receptores aumenta la captura de colesterol de la sangre el cual es después eliminado secretándolo en forma de sales biliares (que después son eliminadas en las heces). Por otro lado, tanto en el hígado como en los tejidos periféricos, la transcripción de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol esta regulada por la proteína SREBP³¹ (“*Sterol Recognition Element Binding Protein*”), un factor de transcripción que reside en la membrana del RE y que, cuando los niveles de colesterol disminuyen, es proteolisado y transportado al núcleo donde induce la transcripción de la HMG-CoA reductasa, (enzima limitante en la síntesis de colesterol) y de receptores LDL (involucrados en la internalización de colesterol de la sangre; ver más adelante).

1.3 Transporte de colesterol

Dada la naturaleza hidrofóbica de la molécula de colesterol, se han desarrollado complejos mecanismos para translocarlo de un lado a otro de la membrana y para transportarlo de y hacia el hígado, regulando los niveles de colesterol en los tejidos periféricos. El transporte de colesterol involucra tanto vías endocíticas como no-endocíticas que a continuación se describen. Adicionalmente, un esquema que

representa las principales vías de transporte de colesterol en mamíferos se presenta en la Figura 4.

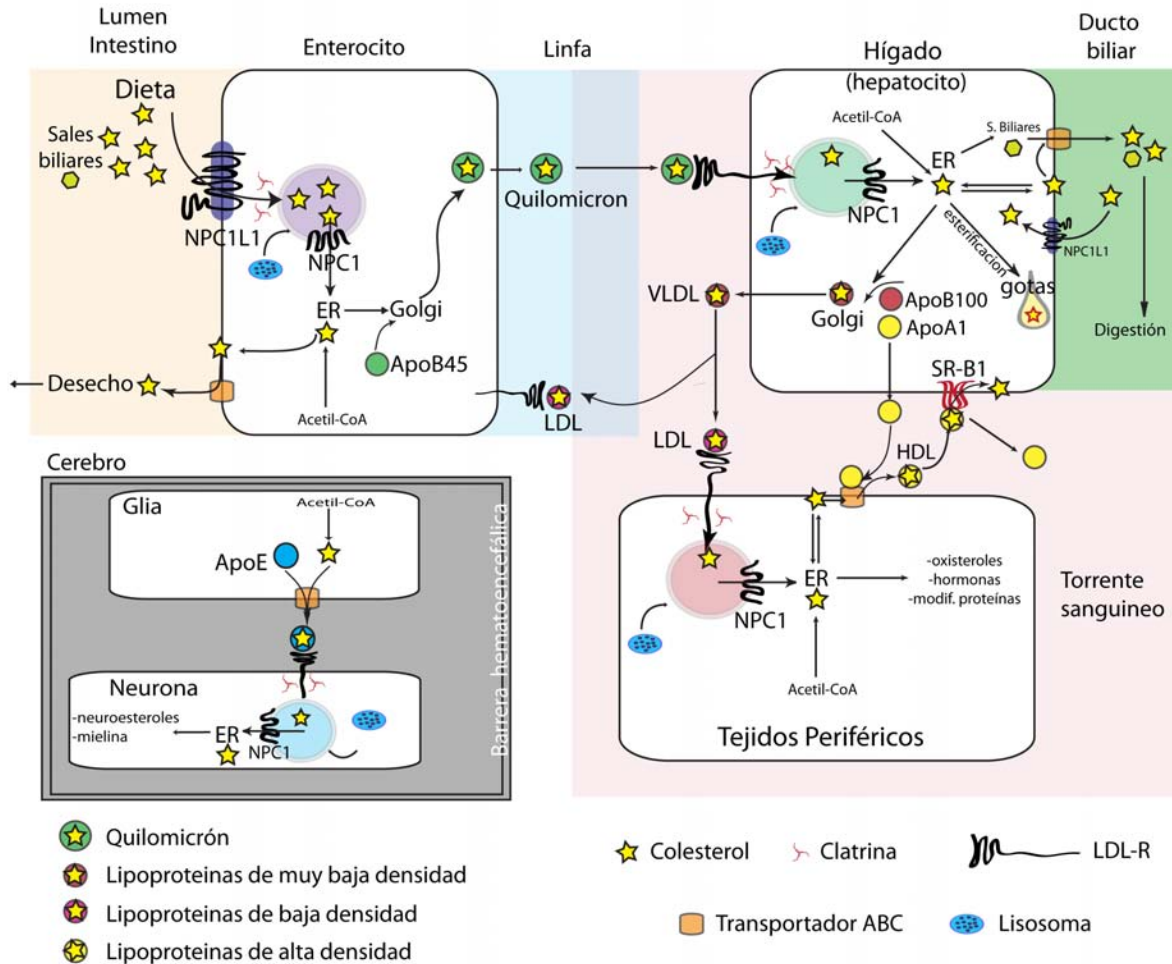


Figura 4. Principales vías de transporte de colesterol en humanos. El colesterol ingerido (o proveniente de sales biliares) es endocitado en los enterocitos del intestino delgado gracias a NPC1L1 vía vesículas de clatrina. Una vez endocitado, escapa de los lisosomas por acción de NPC1 hacia el RE. El exceso de colesterol puede ser regresado al intestino para ser desechado junto con las heces o ser exocitado en forma de quilomicrones a los ductos linfáticos de donde pasan a la sangre. Los hepatocitos endocitan a los quilomicrones a través el receptor de LDL. El colesterol escapa de los endosomas vía NPC1 al RE. En el hígado el colesterol puede ser almacenado en forma de gotas de colesterol esterificado o ser exocitado en forma de VLDL al torrente sanguíneo donde maduran (por la acción de lipasas) a partículas LDL. Las partículas de LDL pueden ser endocitadas en cualquier tejido periférico que exprese al LDL-R. El exceso de colesterol en los tejidos pasa de la MP a ApoA1 (que es secretada por el hígado al torrente sanguíneo) formando las partículas HDL, las cuales translocan su colesterol a la membrana de los hepatocitos vía el receptor SR-B1. En los hepatocitos el colesterol también puede ser excretado al ducto biliar para ayudar a la digestión de grasas. En el SNC la barrera hematoencefálica aísla al cerebro de estas vías por lo que el transporte se da célula a célula mediado por ApoE.

1.3.1 Transporte periférico

Aunque el colesterol puede ser sintetizado en cualquier célula del organismo, el principal tejido productor de colesterol es el hígado donde se sintetiza a partir de Acetil-CoA¹⁵. El colesterol sintetizado en los hepatocitos se almacena en la membrana plasmática y en “gotas de colesterol” en el citoplasma. Por un proceso no del todo esclarecido, la enzima MTP (“*microsomal transfer protein*”) media la formación de un complejo entre el colesterol y la apolipoproteína B-100³² (ApoB-100), una proteína altamente hidrofóbica presente en la membrana y lumen del RE liso, a este complejo se le conoce como VLDL³³ (del inglés, “lipoproteína de muy baja densidad”). Las VLDL son secretadas vía Golgi al torrente sanguíneo donde son modificadas a LDL (del inglés, “lipoproteínas de baja densidad”) por la acción de lipasas que principalmente reducen la cantidad de diacilglicerol de estas. Las partículas de LDL maduras poseen aproximadamente 500 moléculas de colesterol libre y 1500 de colesterol esterificado³⁴. En los tejidos periféricos, las partículas de LDL son internalizadas por receptores que reconocen a la ApoB100, estos receptores LDL (LDLR) poseen un solo cruce transmembranal y son expresados por todas las células del organismo³⁵. Los LDLR median la endocitosis de las partículas LDL vía clatrina, una vez endocitados, los receptores son reciclados a la membrana plasmática mientras que el colesterol pasa a endosomas tardíos. Posteriormente, estos se fusionan con lisosomas donde el colesterol esterificado es hidrolizado por lipasas para generar colesterol libre. Este colesterol des-esterificado escapa de los lisosomas por la acción de NPC1^{36,37} (“*Niemann-Pick disease, type C1*”) (Figura 3A), esta proteína fue identificada porque sus mutaciones se asocian con la acumulación de colesterol en lisosomas del hígado, bazo y cerebro y resultan en neurodegeneración y muerte a temprana edad³⁸. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual NPC1 media el escape del colesterol de los endosomas, se cree que funciona como una bomba que trabaja de manera pasiva ya que posee homología con permeasas bacterianas^{36,39}.

Además de NPC1, existe NPC2⁴⁰, que también se localiza en lisosomas y su ausencia se asocia a la acumulación de colesterol en lisosomas, pero a diferencia de la primera, es una proteína soluble. Modelos estructurales sugieren que, en el lumen del lisosoma, NPC2 actúa como un intermediario entre el colesterol endocitado y NPC1⁴¹.

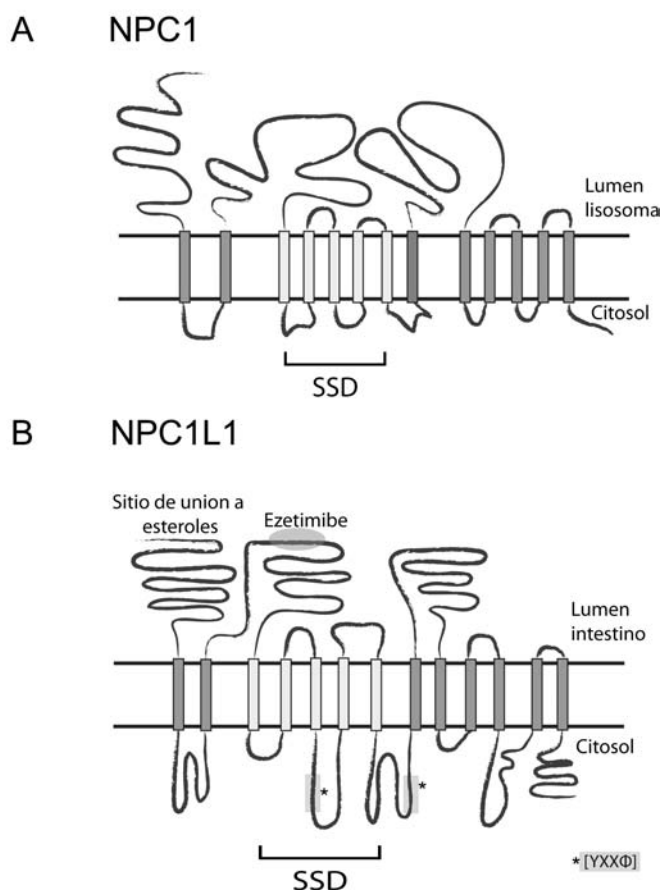


Figura 3. Modelo de la topología de (A) NPC1 y (B) NPC1L1. Ambas proteínas tienen 13 segmentos transmembranales y un dominio sensor de esteroides (SSD: "sterol sensing domain") que abarca del tercer al séptimo cruce transmembranal. Se cree que NPC1L1 tiene un sitio de unión a colesterol en el carboxilo extracelular. Además tiene dos señales [YXXØ] intracelulares que están relacionadas con endocitosis mediada por clatrina. La droga ezetimibe bloquea esta internalización uniéndose al segundo segmento extracelular.

Una vez que el colesterol escapa de los endosomas, este puede ser esterificado por la enzima ACAT1⁴² ("acyl CoA cholesterol acyltransferase 1") que genera una unión entre el hidroxilo del colesterol y un ácido graso generándose un éster de colesterol (Figura 2). Esta modificación le confiere menor solubilidad, lo que ayuda a su almacenaje. El colesterol endocitado también puede ser movilizado a la

membrana plasmática por un proceso no del todo esclarecido, se ha sugerido que el colesterol difunde por y hacia las membranas, pero este hecho sería contradictorio con la baja concentración de colesterol observado en algunas membranas intracelulares (ej: mitocondia, RE)⁴³. Se ha sugerido que existen por lo menos dos vías de tránsito de colesterol entre el RE y la MP³: 1) la vesicular, mediada por vías endocíticas a través de Golgi y el reciclaje de endosomas y 2) las no vesiculares, donde el colesterol es acarreado directamente por proteínas que unen esteroides como START⁴⁴ (“*sterogenesis acute regulatory protein*”) o OSBP⁴⁵ (“*Oxysterol-binding protein*”). En ambos casos, se sabe que las caveolinas en la MP son las zonas de mayor recepción de colesterol de donde puede mobilizarse a otros dominios^{43,46}.

Para regular la cantidad de colesterol en los tejidos periféricos, el colesterol es reenviado al hígado por un mecanismo que se conoce como “transporte reverso de colesterol⁴⁷”. Este transporte se basa en la familia de transportadores ABC (“*ATP-binding cassette transporter*”) que son expresadas en todos los tejidos y utilizan la energía del ATP para translocar el colesterol presente en la MP hacia la apolipoproteína A1 (ApoA1)⁴⁸ circulante en el torrente sanguíneo. Es importante recalcar que este proceso ocurre en el lado extracelular de la MP y no involucra vía endocíticas. A los complejos ApoA1/colesterol se les denomina HDL⁴⁹ (del inglés, “lipoproteínas de alta densidad”). Las HDL recién formadas son blanco de la enzima LCAT⁴⁹ (“*lecithin cholesterol acyltransferase*”) que esterifica al colesterol presente en estas.

Los complejos HDL circulantes en la sangre son reconocidos en el hígado por el receptor SR-B1⁵⁰, este receptor posee dos cruces transmembranales y tanto el carboxilo como el amino terminal son citoplásmicos. Se desconoce cual es el mecanismo exacto por el cual SR-B1 transloca al colesterol, pero se propone que este receptor forma un canal por el cual el colesterol difunde de manera pasiva

de la partícula HDL a la membrana plasmática de los hepatocitos sin involucrar endocitosis de los mismos⁴⁷. Una vez en la MP el colesterol puede ser movilizado al RE para ser metabolizado en sales biliares o almacenado en gotas de colesterol esterificado.

1.3.2 Transporte Intestinal

A pesar de la síntesis *de novo*, se ha reportado que hasta el 80% del total del colesterol puede provenir de la absorción intestinal en humanos⁵¹. Hasta hace poco, se pensaba que el colesterol difundía de manera pasiva del lumen del intestino a los enterocitos intestinales, hoy se sabe que la absorción de colesterol esta mediada por la proteína NPC1L1 (“NPC1-like-1”; Figura 3B) que se expresa en la membrana apical de los enterocitos. Esta proteína posee 13 segmentos transmembranales, un amino extracelular grande y dos secuencias de direccionamiento a lisosomas en el tercer y quinto segmento intracelular. Se ha caracterizado que NPC1L1 une colesterol a través del sitio de unión a esteroides extracelular, esta unión induce un cambio conformacional que provoca la internalización de la proteína mediada por clatrina. La proteína NPC1L1 endocitada es reciclada a la membrana, mientras que el colesterol continúa por las vías endocíticas hasta que es liberado del endosoma tardío/lisosoma por NPC1 y NPC2. Interesantemente, NPC1L1 también se expresa en el ducto biliar donde participa en la reabsorción de sales biliares.

Parte del colesterol endocitado por los enterocitos es devuelto al lumen del intestino por los transportadores ABC G5 y G8, el resto forma complejos con la apolipoproteína B48 en la membrana del RE. A estos complejos se les conoce como Quilomicrones y son exocitados vía Golgi a los ductos linfáticos cercanos al intestino para después pasar a la circulación sanguínea. Los quilomicrones además poseen grandes cantidades de triacilglicerol que van perdiendo por acción de

lipasas sanguíneas al mismo tiempo que adquieren ApoE. Los quilomicrones entonces son internalizados en el hígado a través del receptor de LDL.

1.3.3 Transporte en el Cerebro

El SNC representa un caso particular en lo que se refiere al metabolismo de colesterol ya que, a pesar de ser el tejido con más cantidad de colesterol (15-20 mg/g vs 1.4 mg/g en el músculo)¹⁵, las partículas HDL o LDL no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, lo que aísla al cerebro del sistema de intercambio de colesterol con el hígado. Por esta razón el colesterol en el SNC proviene exclusivamente de la síntesis *de novo* a partir de acetil CoA. Sin embargo, existe transporte intercelular entre células de la glía (astrocitos) y neuronas a través de la apolipoproteína E (apoE) que también es reconocida por el LDLR expresado en el cerebro. En el SNC el colesterol está involucrado con la mielinización, la neurogénesis y el desarrollo (vía SH) e incluso está involucrado con la regulación de varios canales y receptores. Además es el precursor de neuroesteroides y oxiesteroles exclusivos de cerebro.

1.4 Dominios de unión a colesterol

Dada la diversidad de funciones biológicas en las que participa el colesterol (o sus derivados), resulta lógico que existan un gran variedad de proteínas capaces de unirlo. En general, el reconocimiento de este esteroles se basa en su estructura plana y en sus características hidrofóbicas, pero también en el grupo polar hidroxilo que posee en el carbono 3. A continuación describimos dos motivos encontrados comúnmente en proteínas que unen colesterol:

1.4.1 Dominio Sensor de Esteroles (SSD)

El dominio sensor de esteroides, o SSD (del inglés, “*sterol sensing domain*”), es un dominio transmembranal que abarca 5 cruces (~180 aminoácidos) y está conservado en una serie de proteínas involucradas en el transporte, metabolismo y regulación de colesterol⁵², como la HMG-CoA reductasa, SCAP (la proteína que media la proteólisis de SREBP), Patch, y NPC1L1.

El papel exacto del SSD está en debate, pero se propone que puede unirse directamente al colesterol, por ejemplo, el presente en la membrana plasmática, el cual podría inducir un cambio conformacional. También se propone que pueda interactuar con proteínas unidas al colesterol.

En otras proteínas transmembranales con SSD, (e.g. NPC1), se ha identificado un sitio de unión al colesterol extracelular en el dominio N-terminal⁴¹, ese dominio está compuesto por hélices alfa que forman una cavidad en donde puentes de hidrógeno (entre aminoácidos y agua) estabilizan el grupo hidroxilo del colesterol. En este acomodo, los 4 anillos de la molécula quedan “enterrados” en la cavidad y solo la cadena alifática está parcialmente expuesta. Esta orientación es inversa a la observada en NPC2, donde en una cavidad similar, el grupo OH queda expuesto.

1.4.2 Motivo CRAC

El motivo CRAC (del inglés, “*cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*”) fue inicialmente identificado en el receptor periférico de benzodiazepinas humano⁵³, una proteína capaz de mediar la translocación de colesterol en la membrana de la mitocondria. Actualmente, este tipo de motivos han sido identificados en una gran variedad de proteínas involucradas con

modificar el colesterol (e.g. colesterol monooxigenasa, oxidasa, deshidrogenasa, esterasa); o unir colesterol (e.g. ApoA1, caveolina, STAR, hedgehog, citocromo P450 C26/25, anexina II), pero también en canales y receptores⁵⁴⁻⁵⁶, donde la interacción entre el colesterol y sus motivos CRAC participa en su regulación. Incluso están presente en gp41 de VIH, participando en la internalización del virus⁵⁷.

Linealmente, el motivo está conformado por una Leucina o Valina (aminoácidos neutrales e hidrofóbicos), una Tirosina (neutral y polar) y una Arginina o Lisina (aminoácidos básicos): L/V-(X)₁₋₅-Y-(X)₁₋₅-R/K. Entre uno y otro aminoácido hay una separación que varía de entre 1 y 5 aminoácidos. Estructuralmente, se propone que el motivo genera una especie de “surco”, donde la Leucina o Valina interactúan con la cadena alifática del colesterol, y la Tirosina con el grupo hidroxilo⁵⁸. Por su parte, la arginina o Lisina ayudan a crear la “cavidad” donde la molécula de colesterol se acopla. La mayoría de los motivos CRAC se ha identificado en proteínas transmembranales, usualmente aledaños a las regiones transmembranales^{59,60}.

1.5 El nemátodo *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nemátodo transparente de vida libre que habita en suelos templados de todo el mundo alimentándose de bacterias, mide aproximadamente 1.2 mm y presenta simetría bilateral⁶¹. Tiene un genoma de 97 megabases organizado en 5 autosomas y un cromosoma sexual del cual depende su sexo^{62,63}: dos cromosomas los hermafroditas y uno los machos. Sin embargo, los machos son extremadamente poco abundantes alcanzando apenas el 0.05% del total de la población en condiciones normales.

Este nemátodo tiene la característica de poseer un número fijo de células⁶⁴: 959 el hermafrodita y 1031 el macho, lo que ha permitido mapear todas las divisiones celulares desde la fecundación del óvulo hasta los animales adultos, haciendo a este organismo un extraordinario modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación celular. Adicionalmente ha sido utilizado para estudiar diversos procesos biológicos que van desde metabolismo⁶⁵ y enfermedades⁶⁶, hasta la caracterización de los circuitos neuronales involucrados en la memoria⁶⁷.

1.5.1 Anatomía

La anatomía básica de *C. elegans* comprende la boca, la faringe, el intestino y la gónada⁶¹ (Figura 5A). Recubriendo el cuerpo del nemátodo hay una cutícula impermeable hecha de colágena que lo aísla del medio⁶⁸, además, entre el cuerpo y la cutícula hay una cavidad (*pseudocolematida*) llena de líquido a alta presión que le confiere su forma cilíndrica. En la cabeza hay una gran cantidad de neuronas que inervan, entre otras estructuras, dos líneas de células musculares a lo largo del gusano que le permiten moverse⁶⁷.

C. elegans se alimenta de bacterias y desechos del medio en el que habita gracias a que los músculos de la faringe bombean constantemente líquido hacia el bulbo terminal de la faringe donde una estructura denominada “molino” o “grinder” literalmente tritura a las bacterias antes de pasar al intestino⁶⁹. El intestino esta compuesto por 20 células multinucleadas organizadas en pares para formar 10 discos alrededor del lumen del intestino⁷⁰ (Figura 5B), estas células poseen microvilli y son las encargadas tanto de secretar proteasas y ribonucleasas para la digestión, como de absorber los nutrientes⁷⁰. El intestino también es el tejido donde ocurre la modificación y almacenaje de lípidos y carbohidratos, que de hecho pueden ser vistos por microscopia en forma de gránulos y vesículas en las células del intestino.

Los hermafroditas poseen una gónada doble en cuya parte distal se producen ovocitos que migran hacia el útero conforme maduran⁶¹. En este proceso pasan por la espermateca, dónde son fecundados por los espermatozoides del mismo animal⁷¹. Los ovocitos recién fecundados son expulsados por la vulva donde completan su desarrollo. Un sólo hermafrodita produce ~300 embriones durante su vida reproductiva de 4 días. Por su parte los machos solo producen espermatozoides que utilizan para fecundar hermafroditas mediante una cola especializada para el apareamiento⁷²; si una hermafrodita es fecundada por un macho, el esperma de este será usado en vez del propio, llegándose a producir hasta 1000 embriones. Los embriones eclosionan extrauterinamente dando origen a animales que pasan por cuatro etapas larvarias⁶¹ (L1 a L4, Figura 5C) antes de convertirse en adultos fértiles. Dado que este nemátodo posee una dura cutícula de colágena, entre una y otra etapa larvaria existe una muda para eliminar a la cutícula vieja y secretar una nueva⁷³. En condiciones normales, el ciclo de vida de *C. elegans* dura aproximadamente 3 días y tiene una vida media de entre 2 y 3 semanas dependiendo de la temperatura⁶¹. En condiciones de estrés como un incremento de la temperatura o la falta de alimento en el medio aunado a sobrepoblación, las larvas L1 optan por un estado larvario especial denominado “dauer”⁷⁴, en el que dejan de bombear alimento y entran en un estado metabólico que les permite soportar condiciones adversas hasta por 4 meses; si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, las larvas dauer reanudan el desarrollo en L4.

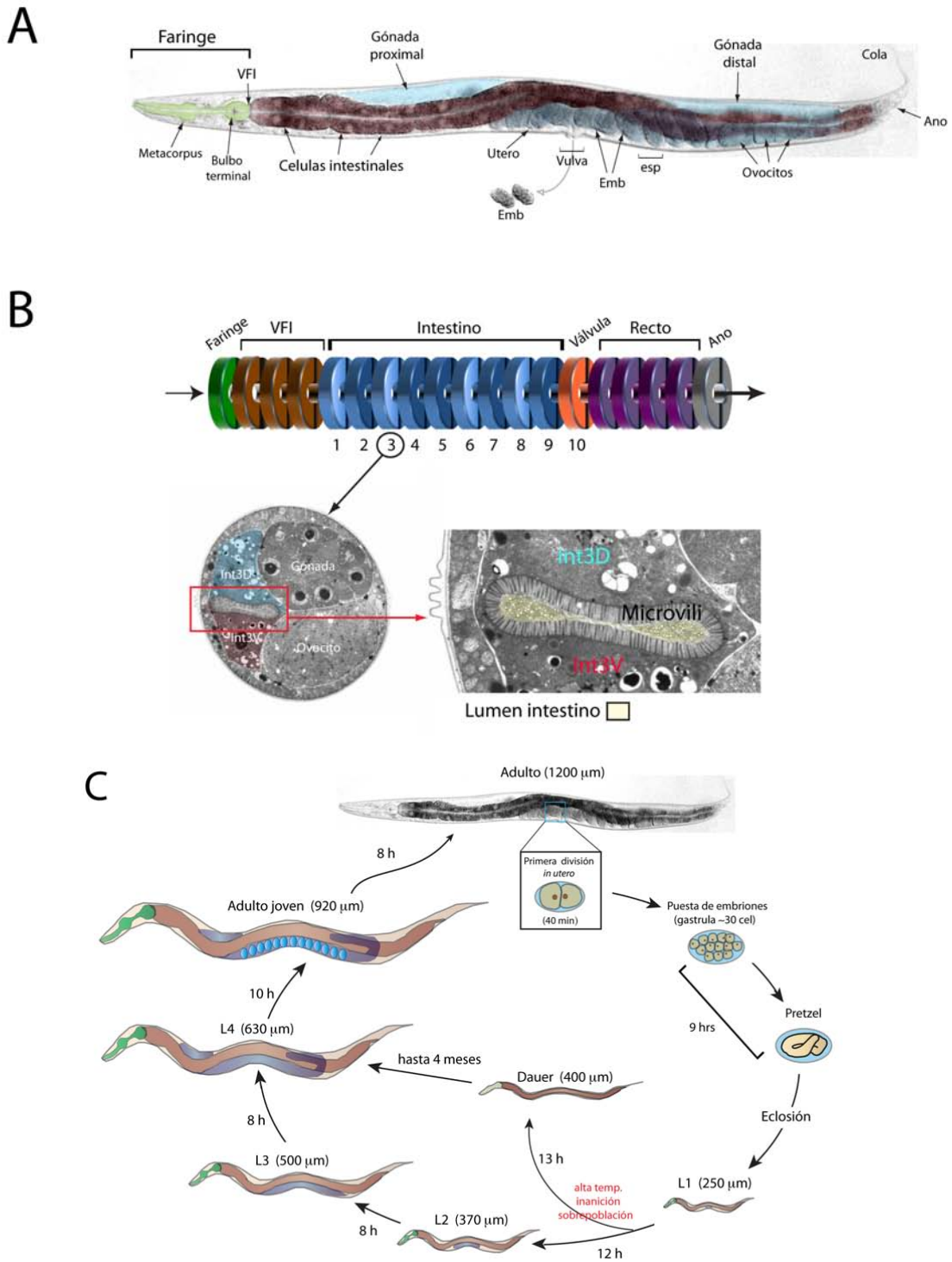


Figura 5. El nemátodo *Caenorhabditis elegans*. (A) **Anatomía.** Fotografía de un hermafrodita donde se resaltan las principales estructuras anatómicas: en verde los dos bulbos de la faringe, en marrón el intestino y en azul ambos brazos de la gónada. VFI: válvula faringeo-intestinal, Emb: embriones, esp: espermateca. (B) **Modelo del sistema digestivo.** Se muestra la célula más distal de la faringe y los 3 discos que forman la VFI. Los pares de células que forman el intestino están numerados. En el panel inferior se muestra una imagen de microscopía electrónica (tomada de WormAtlas.org) del tercer disco del intestino. En azul se muestra la célula intestinal distal (Int3D) y en rojo la célula intestinal ventral (Int3V). El recuadro indica un aumento a la zona del lumen del intestino donde se aprecia el microvilli. (C) **Ciclo de Vida.** Los óvulos son fecundados *in utero* llevando a cabo la primera división antes de ser expulsados. Los embriones eclosionan extrauterinamente y pasan por cuatro etapas larvarias (L1 a L4) en aproximadamente 28 hrs a 22 °C. Los adultos jóvenes ya poseen ovocitos en el útero aunque la puesta de embriones comienza después de 8 hrs.

1.5.2 Importancia del colesterol

A diferencia de los animales, *C. elegans* no puede sintetizar colesterol de manera endógena pues no cuenta con las enzimas escualeno sintasa ni escualeno ciclasa⁷⁵, necesarias para biosintetizar escualeno y lanosterol, dos metabolitos centrales en su síntesis (ver Figura 2). *C. elegans* obtiene colesterol de la ingestión de desechos animales presentes en el medio, o bien de esteroides de plantas y hongos que luego metaboliza a colesterol⁷⁶. También se ha demostrado que obtiene esteroides de la ingesta de bacterias, que si bien no pueden sintetizar esteroides, sí los pueden incorporar en sus membranas cuando estos están presentes en el medio⁷⁷. Mediante el uso de análogos fluorescentes de colesterol y tinción de lípidos, se ha observado que algunas zonas y estructuras en el nemátodo son ricas en colesterol como la faringe, el intestino y los ovocitos⁷⁸.

En condiciones experimentales, se agregan de 5 a 8 µg/mL de colesterol que se suman a los esteroides presentes en el agar y extracto de levadura utilizados en la elaboración del medio⁶¹. Omitir la suplementación de colesterol (pero manteniendo el agar y extracto de levadura) resulta en un decremento en el tamaño e índice de crecimiento, un aumento en la letalidad embrionaria^{79,80} y problemas en la movilidad de los gusanos^{68,69,81}, también se han reportado alteraciones en la proliferación y diferenciación de las células de la línea germinal⁸². La completa privación de colesterol resulta en fenotipos más severos que se asocian a problemas en la locomoción y mudas de los gusanos^{81,83,84}. Además, se observa un arresto generalizado de las larvas L2 que entran en un estado que, aunque similar a dauer, mueren al poco tiempo^{81,85}. Sin embargo, se observa que la primera generación de gusanos es relativamente normal, y es hasta la segunda generación de animales creciendo sin colesterol donde se observan los fenotipos mencionados. Este resultado demuestra que las madres son capaces de proveer de colesterol a la progenie^{80,85}. Sin embargo, el colesterol es requerido solo en cantidades bajas: se ha reportado que animales creciendo en 300 ng/mL de colesterol presentan tamaño y fertilidad normales⁷⁹.

Contrario a las células de mamíferos, se ha establecido que las membranas celulares de *C. elegans* prácticamente no contienen colesterol^{75,78}, por lo que se propone que, más que un papel estructural, el colesterol en *C. elegans* es necesario para la producción de hormonas esteroideas que controlan las etapas de desarrollo y a su vez están involucradas en la diferenciación y proliferación celular^{75,80,86}. En este sentido, un análisis del genoma de *C. elegans* predijo más de 260 receptores hormonales⁸⁷ y se ha identificado al ácido dafacrónico (o gramravali) como un esteroide derivado del colesterol involucrado en la regulación del desarrollo y reproducción de los nemátodos^{75,85}. Adicionalmente, *C. elegans* puede modificar esteroides de una manera particular para producir esteroides metilados (Figura 6) cuya presencia ha sido relacionada con el control de desarrollo^{79,81}. En contraste, los mamíferos invierten una gran cantidad de energía para llevar a cabo las modificaciones opuestas.

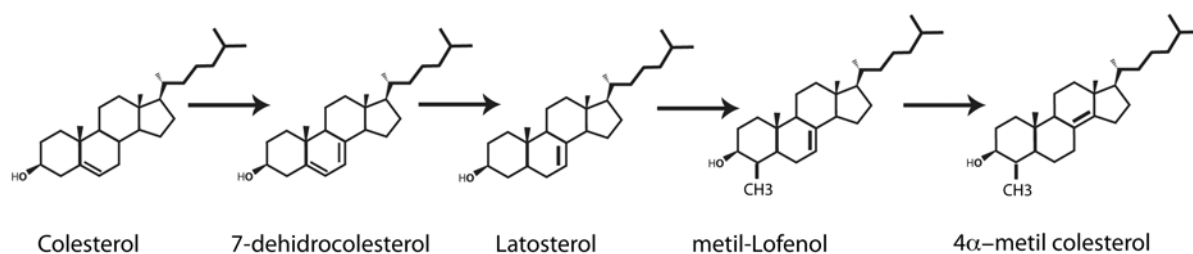


Figura 6. Biosíntesis de esteroides metilados en *C. elegans*. La deshidrogenación del colesterol en la séptima posición genera 7-dehidrocolesterol el cual es metilado en el cuarto carbono del primer anillo para generar 4alfa-esteroides. Esta modificación es exclusiva de nemátodos.

1.5.3 Transporte de colesterol en *C. elegans*

A pesar de la importancia de los esteroides en *C. elegans*, se desconoce el mecanismo molecular responsable de la toma de colesterol del medio ambiente. *C. elegans* posee dos genes homólogos a NPC-1 (la proteína responsable del escape del colesterol internalizado de los lisosomas en mamíferos) denominados NCR-1 y NCR-2 (“NPC Related”); el primero se expresa en tejidos con alto contenido de colesterol y el segundo sólo en dos neuronas involucradas con la formación de

larvas dauer^{88,89}. La falta de NCR-1 resulta en problemas en el crecimiento cuando los animales crecen en condiciones de bajo colesterol mientras que la carencia de ambos genes de manera simultánea resulta en el establecimiento constitutivo del estado larvario dauer. Sin embargo, se ha descartado que estos genes tengan algún papel en la toma de colesterol del medio ambiente⁹⁰, y por el contrario sólo participan en el transporte intracelular de colesterol. Los fenotipos asociados a su ausencia probablemente se deban a problemas en el metabolismo de hormonas esteroideas involucradas en la inhibición del estado larvario dauer.

Por otro lado, en *C. elegans* existen homólogos de la súperfamilia de receptores LDL que en mamíferos median la endocitosis de lipoproteínas. Se ha propuesto que uno de ellos, LRP-1 (“LDL receptor-like protein-1”) pudiera estar involucrado con la internalización de colesterol puesto que sus mutaciones se asocian a fenotipos parecidos a los observados ante la ausencia de colesterol⁸³ (problemas en la muda, arresto del crecimiento). Sin embargo, los animales carentes de *lrp-1* son normales en cuanto a tamaño y fertilidad. Por otro lado, LRP-1 se expresa exclusivamente en el epitelio exterior encargado de secretar la cutícula de colágena y dada la naturaleza impermeable de ésta, sería improbable que el colesterol pueda atravesarla para luego ser internalizado vía LRP-1. La evidencia indica que LRP-1 en realidad promueve la degradación de la cutícula durante las mudas del nemátodo secretando proteasas y colagenasas^{83,91}, lo que explicaría los problemas en el crecimiento observados en la mutante, pero descarta su papel en la internalización de colesterol.

Otra miembro de la familia de receptores LDL en *C. elegans* es RME-2⁹² (“Receptor-mediated Endocytosis”), que se expresa en los ovocitos mediando la internalización de vitelogeninas. Las vitelogeninas son lipoproteínas que unen colesterol (equivalentes a ApoB de mamíferos) y que son secretadas por las células del intestino del nemátodo hacia la cavidad pseudocolematida⁹³. Sin

embargo, es claro que REM-2 no podría ser responsable de la toma de colesterol proveniente del medio ya que por un lado es improbable que el colesterol se encuentre en forma de vitelogeninas en el medio ambiente, y por otro, la expresión de RME-2 es exclusiva de la gónada de hermafroditas L4 y adultos, y la toma de colesterol ha sido caracterizada tanto en machos como larvas L1-L3⁷⁸.

Dado que *C. elegans* es un organismo auxótrofo para esteroides, resulta un excelente modelo para estudiar a fondo las vías de internalización de colesterol, hecho que toma relevancia si tomamos en cuenta que en humanos los altos niveles de colesterol en sangre – que en gran medida dependen de la internalización a nivel intestinal – se relacionan con graves enfermedades y padecimientos: desde enfermedades coronarias hasta Alzheimer⁹⁴.

Mediante estudios de análisis genómicos⁹⁵, se identificó en el nematodo *C. elegans* un marco de lectura abierto en el cromosoma X al que se denominó como “*temporally assigned gene 130*” (*tag-130*) y a su transcrito como ZK721.1, sin embargo en la literatura o en las bases de datos no se reportan fenotipos asociados a la ausencia de dicho gen. Nosotros identificamos motivos de unión a colesterol extracelular y otro transmembranal en ZK721.1 (ver Resultados) y una topología similar a la de NCP1L1 humano. En el presente trabajo demostramos el involucramiento de *tag-130/ZK721.1* en el metabolismo de colesterol de *C. elegans* por lo que renombramos a esta proteína como CUP-1 (del inglés “Cholesterol Uptake Protein -1”) y así nos referiremos a ella en lo sucesivo.

2. HIPÓTESIS

A) La proteína ZK721.1/CUP-1 de *C. elegans* esta involucrada con el metabolismo de colesterol dado que posee dominios de unión a colesterol y una topología parecida a proteínas involucradas con la internalización de colesterol en mamíferos.

B) Dado que *C. elegans* es auxótrofo para esteroides, la ausencia de ZK721.1/CUP-1 tiene fenotipos similares a la privación de colesterol.

C) Las proteínas de mamíferos SIDT1 y SIDT2, homologas de ZK721.1/CUP-1, también están relacionadas con el metabolismo de colesterol.

3. OBJETIVOS

Empleando a *C. elegans* y cultivos de líneas celulares de mamíferos como modelos, nos planteamos como objetivo general demostrar experimentalmente el involucramiento de CUP-1, SIDT1 y SIDT2 en el metabolismo de colesterol. Para lograrlo nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

- 1 - Comprobar que la ausencia de CUP-1 en *C. elegans* se relaciona con fenotipos asociados a la privación de colesterol.
- 2 - Comprobar el involucramiento de CUP-1 en la internalización de colesterol del medio ambiente en *C. elegans*.
- 3 - Caracterizar la localización subcelular de CUP-1, SIDT1 y SIDT2
- 4 - Demostrar experimentalmente la interacción física entre CUP-1, SIDT1, y SIDT2 con colesterol.
- 5 - Caracterizar la expresión de espacio temporal de CUP-1, SIDT1, y SIDT2

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de CUP-1 como una proteína asociada al metabolismo de colesterol

El análisis del perfil de hidrofobicidad de la proteína CUP-1 de *C. elegans* predice un péptido señal (18 Aa) en el amino terminal seguido de nueve segmentos transmembranales. En cuanto a su topología, se predice un amino terminal extracelular relativamente grande (poco más de un tercio de la proteína) y un carboxilo terminal corto del lado citoplásmico (Figura 7). Mediante análisis *in silico*, se identificaron sitios de N-glicosilación en la porción amino-terminal extracelular. También, se identificaron dos motivos de endocitosis basado en lisinas en el primer segmento intracelular, estos dominios han sido identificados en proteínas que participan en endocitosis y transporte vesicular además del direccionamiento a lisosomas⁹⁶.

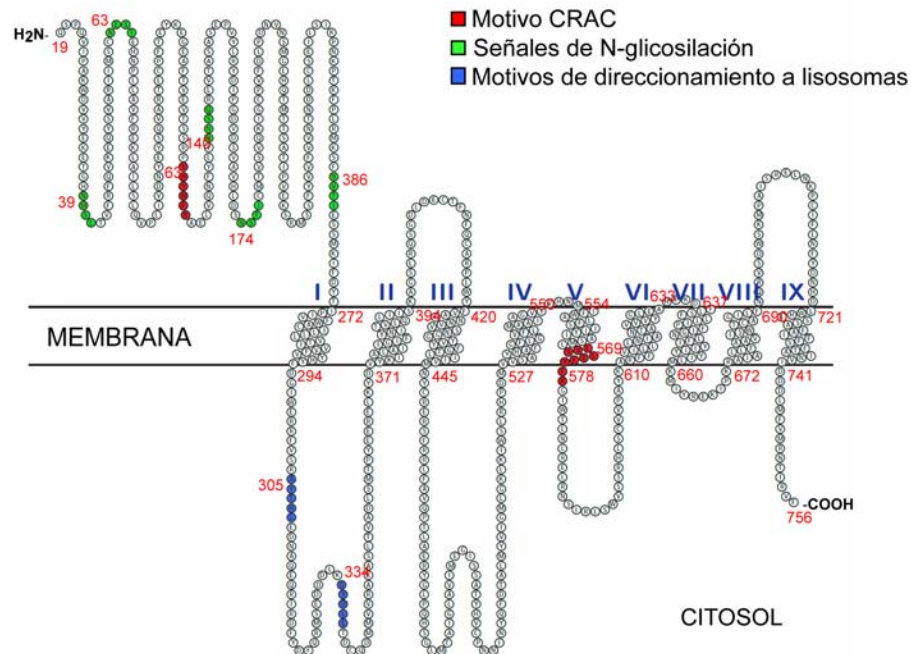


Figura 7. Modelo de la topología de “Cholesterol Uptake Protein-1” de *C. elegans*. El modelo fue construido a partir de los perfiles de hidrofobicidad de la proteína. Los números romanos indican los nueve cruces transmembranales. Los números en rojo indican el residuo de amino ácido. Los dominios CRAC conservados (L/V-X(1-5)-Y-X(1-5)-R/K) en las posiciones 62 y 565 se muestran en rojo. Los primeros 18 aminoácidos se predicen como el péptido señal por lo que fueron excluidos del modelo. Motivos de endocitosis basados en lisinas: YXXL/DXXLL se muestran en azul.

Un análisis cuidadoso de la secuencia de aminoácidos de CUP-1 reveló además la presencia de por lo menos dos dominios CRAC (“*cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*”) conservados, el primero en el carboxilo extracelular y el otro en el quinto segmento transmembranal. (Figura 7). Los dominios CRAC están involucrados con la unión de colesterol y han sido observados tanto en proteínas relacionadas con la modificación de colesterol como en la translocación de éste de un lado a otro de una membrana^{58,97}.

Basados en esta evidencia nos preguntamos si CUP-1 estaría implicado en el metabolismo de colesterol en el nematodo *C. elegans*. Este organismo modelo tiene la ventaja de ser auxotrofo para colesterol ya que carece de las enzimas necesarias para su síntesis y por lo mismo depende enteramente del suministro exógeno de colesterol.

Para evaluar el involucramiento de CUP-1 en el metabolismo de colesterol de *C. elegans* empleamos a la cepa *gk245* que tiene una delación de 700 pb abarcando el promotor y el primer exón de *cup-1* (Figura 8A). A dicha cepa nos referiremos en lo sucesivo como *cup-1(gk245)*. El primer paso fue corroborar mediante RT-PCR la ausencia del mensajero de CUP-1. Como se observa en la Figura 8B, en la cepa *cup-1(gk245)* no detectamos la presencia del mensajero de CUP-1.

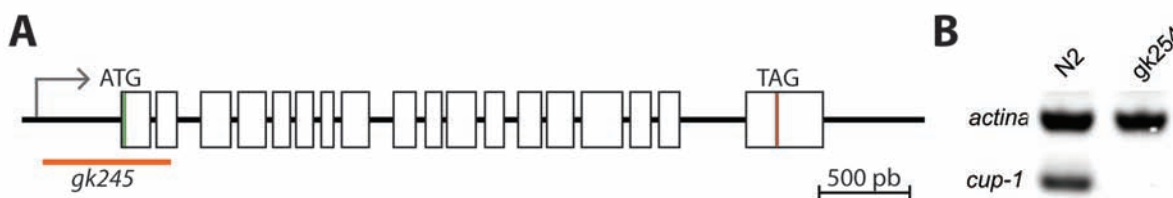


Figura 8. Ausencia del RNA mensajero de CUP-1 en la cepa *cup-1(gk245)*. (A) Modelo del locus genómico de *cup-1* en *C. elegans*: cada rectángulo representa un exón del gen, los codones de inicio (ATG) y de término (TAG) se muestran en la figura al igual que la delación de la cepa *gk245* que abarca el promotor y parte de la secuencia codificante. (B) RT-PCR del mensajero de CUP-1 que demuestra la ausencia de éste en la cepa *cup-1(gk245)*. Como control positivo se amplificó el gen de actina de *C. elegans*.

En condiciones estándar, se agregan 8 $\mu\text{g/L}$ (20.7 mM) de colesterol para mantener el crecimiento y reproducción de *C. elegans*. La completa privación de colesterol en la dieta resulta en letalidad embrionaria y muerte prematura de los nemátodos por lo que para evaluar la sensibilidad de la cepa carente de CUP-1 [*cup-1(gk245)*] a la privación de colesterol, los animales fueron crecidos en un medio al cual no se le agregó colesterol pero que aun contiene cantidades trazas de esteroides provenientes del agar y el extracto de levadura empleados en la preparación del medio. En estas condiciones las cantidades traza de colesterol permiten obtener gusanos que crecen y se reproducen, pero que al mismo tiempo presentan los fenotipos asociados a la carencia de colesterol como el decremento en la fertilidad, disminución del tamaño o problemas en la movilidad entre otros.

Dado que ha sido demostrado que el colesterol heredado de los gusanos parentales es suficiente para satisfacer las necesidades de esteroides en la primera generación de gusanos, todas las mediciones se hicieron en la filial 2 de gusanos creciendo en las condiciones de privación de colesterol antes mencionadas.

4.2 La ausencia de CUP-1 resulta en un decremento de la fertilidad de *C. elegans* ante la carencia de colesterol en el medio.

El primer fenotipo evaluado fue el número de hijos, en condiciones estándar (medio más colesterol) no se detectaron diferencias significativas entre la cepa *cup-1(gk245)* y la cepa silvestre: 272 ± 35 vs 250 ± 13 embriones por gusano, respectivamente (Figura 9A). Cuando los animales crecieron en un medio al cual no se le agregó colesterol, se observó una reducción de aproximadamente el 50% en el número de hijos de la cepa *cup-1(gk245)* en comparación con la cepa silvestre: 73 ± 7 vs 131 ± 20 embriones por gusano, respectivamente (Figura 9B). Si comparamos estos números con los de los animales creciendo en medio con colesterol, la disminución en la cepa carente de CUP-1 llega al 70%, (Figura 9C)

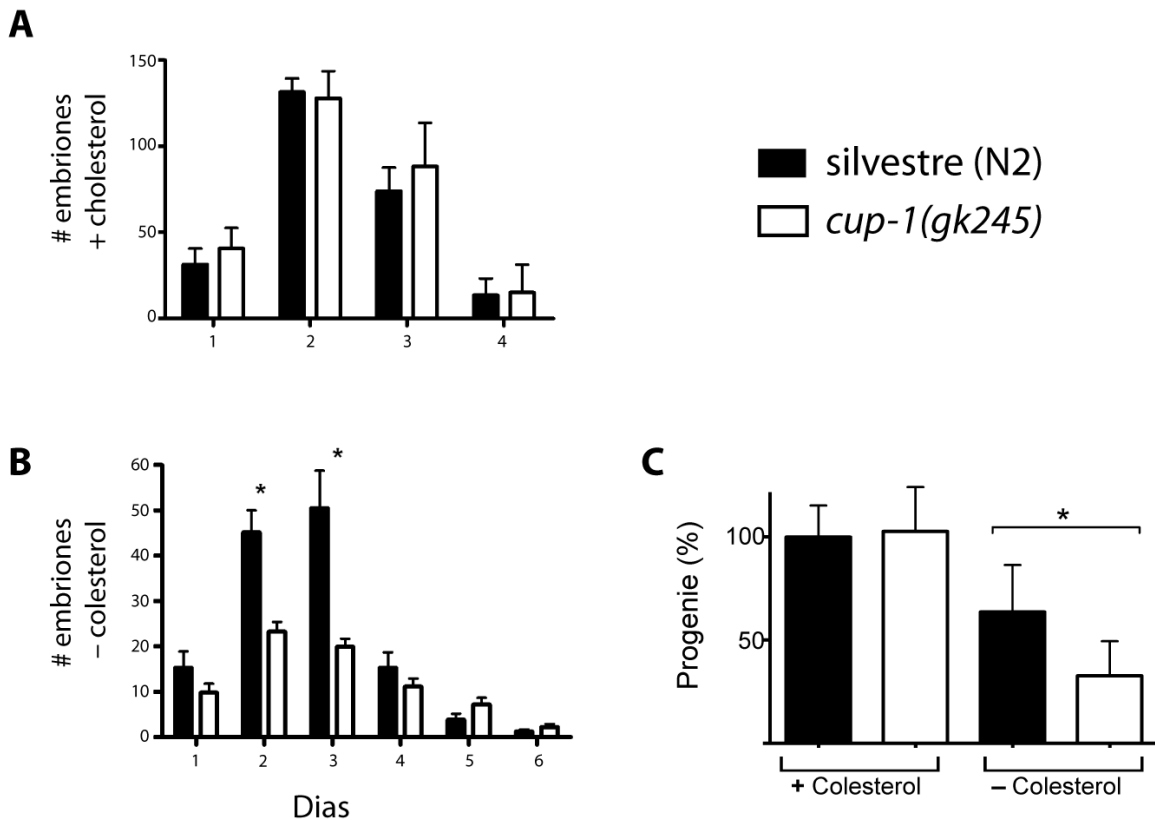


Figura 9: Disminución en el número de hijos de *cup-1(gk245)* creciendo en ausencia de colesterol. Animales silvestres (N2) y carentes de CUP-1 [*cup-1(gk245)*] crecieron en presencia (A) o en ausencia (B) de colesterol en el medio y el promedio de embriones fue evaluado día a día por gusano. (C) Progenie total por gusano normalizado al 100% de N2 en presencia de colesterol. Barra de error: desv. est. * $p < 0.05$

Al examinar las gónadas de los nematodos teñidas con el colorante nuclear DAPI, observamos alteraciones en la distribución de los ovocitos dentro de la gónada de los animales *cup-1(gk245)* cuando estos crecen en un medio no complementado con colesterol (Figura 10A). Estas alteraciones son incluso evidentes mediante microscopía tipo Nomarski, donde se observa un arreglo en “doble hilera” en el 47% de los animales *cup-1(gk245)*, contrario a la cepa silvestre donde todos los ovocitos están en una sola línea (Figura 10C). Al evaluar el número de ovocitos dentro de la gónada de estos animales, observamos una disminución del 60% (Tabla 1) y al cuantificar el número de embriones viables detectamos un

incremento de cinco veces en la letalidad embrionaria en comparación con la cepa silvestre (Tabla 1). Cabe mencionar que en las tinciones con DAPI no vimos alteraciones en la distribución de los espermatozoides (Figura 10B) ni en el número de esos (Tabla 1). Este dato concuerda con la noción de que en *C. elegans*, el colesterol es importante para la ovogénesis pero no es necesario para la espermatogénesis^{79,80}.

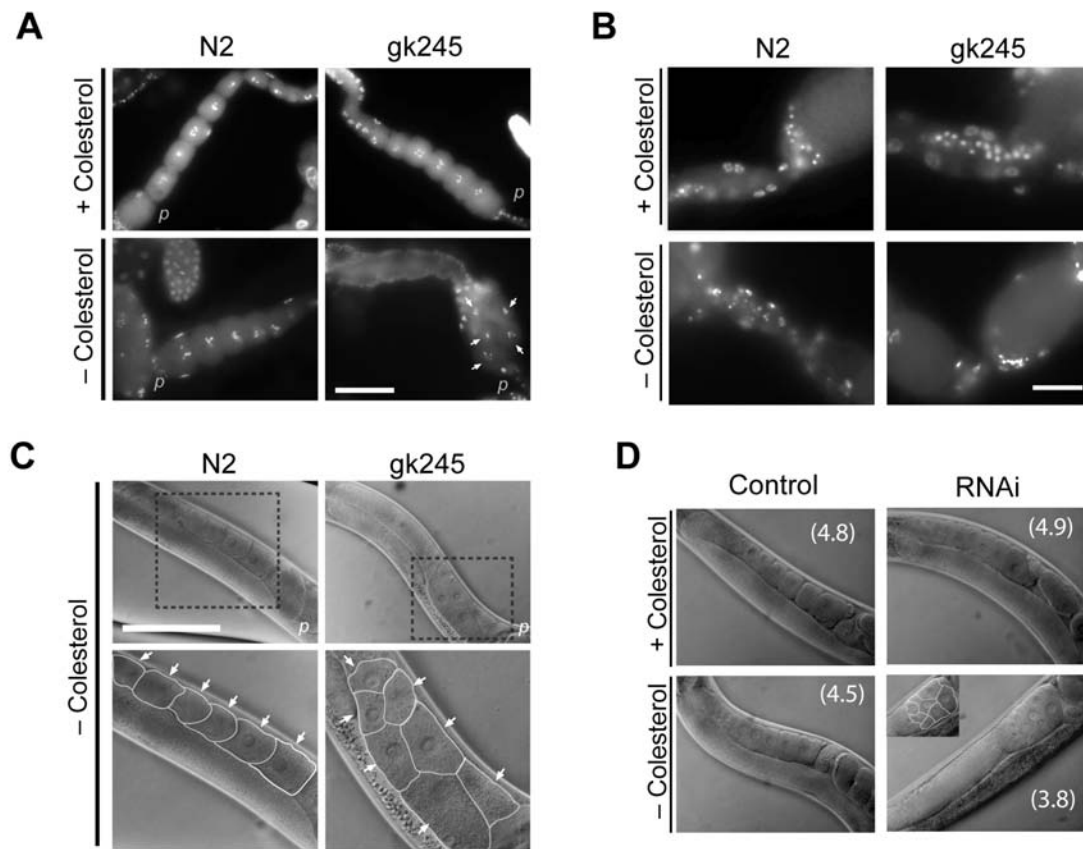


Figura 10. Defectos en la ovogénesis en animales carentes de CUP-1. (A) Tinción con DAPI de gónadas de nemátodos silvestres y mutantes de CUP-1 creciendo con y sin complementación de colesterol. Las flechas indican los núcleos de ovocitos donde se detectan alteraciones en la organización dentro de la gónada. (B) Tinción con DAPI de la espermateca. (C) Microscopia Nomarski de gónadas de animales creciendo sin complementación de colesterol. Los rectángulos indican las áreas apiadas en el panel inferior. Las flechas blancas indican los ovocitos. Las membranas fueron resaltadas en blanco para mayor claridad. (D) Microscopia Nomarski de animales alimentados con un plásmido vacío (control) y animales donde se silenció la expresión de CUP-1 mediante RNAi. Los números entre paréntesis indican el número promedio de ovocitos dentro de la gónada para cada condición. p: proximal. Barra de escala: 100 μ m.

Para corroborar que las alteraciones en la distribución y número de ovocitos fueran resultado específico de la ausencia de CUP-1 y no de alguna otra mutación secundaria no identificada en la cepa *cup-1(gk245)*, se evaluaron las alteraciones en la ovogénesis en animales dónde, por medio de RNAi, se silenció la expresión de CUP-1. En estos animales RNAi se observa el arreglo “doble” idéntico al que presentó la cepa mutante *cup-1(gk245)* al igual que una disminución en el número de ovocitos al crecer en medio sin complementación de colesterol (Figura 10D)

Tabla 1 | Hipersensibilizada de la cepa *cup-1(gk245)* a la ausencia de colesterol

Cepa	Colesterol	Espermatozoides (prom \pm d.s)	Ovocitos (prom \pm d.s)	Letalidad embrionaria (% \pm d.s)	Desarrollo larvario (% \pm d.s)	Dauers (% \pm d.s)
N2	+	110.2 \pm 11.5	5.8 \pm 0.73	0.28 \pm 0.27	100 \pm 0.0	2.8 \pm 0.3
	-	117.8 \pm 10.8	5.5 \pm 0.78	0.32 \pm 0.45	98.6 \pm 1.8	8.0 \pm 0.5
<i>gk245</i>	+	111.0 \pm 11.2	5.2 \pm 0.85	0.57 \pm 0.46	98.9 \pm 1.3	0.5 \pm 0.2*
	-	110.3 \pm 10.2	3.3 \pm 1.1*	3 \pm 1.0 *	78.2 \pm 16.4 *	2.2 \pm 0.6*

Animales silvestres (N2) y carentes de CUP-1 (*gk245*) fueron crecidos en medio complementado con colesterol (+) o en condiciones de bajo colesterol (-). Los fenotipos fueron evaluado en la progenie F2. El número de espermatozoides y ovocitos fue cuantificado a partir de gónadas teñidas con DAPI. La *Letalidad embrionaria* se define como el porcentaje de embriones no eclosionados después de 24 h. El *Desarrollo larvario* es el porcentaje de larvas L1 que llegaron a ser Adultos. El porcentaje de larvas *Dauers* fue cuantificado a partir de las larvas que sobrevivieron un tratamiento de SDS después de 15 días de cultivo a 25 °C. Para el número de espermatozoides y ovocitos, n > 40; Letalidad embrionaria y Desarrollo larvario, n > 70 de tres determinaciones independientes. Para %Dauers, n > 1500. * p < 0.01 respecto a +colesterol. d.s: desviación estándar.

Así pues, observamos que en un medio no complementado con colesterol, la ausencia de CUP-1 resulta en animales con alteraciones en la distribución de los ovocitos dentro de la gónada además de un menor número de estos y en una mayor letalidad embrionaria que en conjunto resultan en un decremento significativo en el número de hijos de esta cepa. Aunque también detectamos un

decremento en el número de hijos en la cepa silvestre al crecer sin colesterol, éste no fue tan marcado y además no presentaron alteraciones en la distribución o número de ovocitos. En conjunto, estos resultados nos hablan de que la ausencia de CUP-1 está relacionada con una mayor sensibilidad a la carencia de colesterol disponible en el medio de cultivo.

4.3 La ausencia de CUP-1 afecta el crecimiento, la movilidad y la resistencia al estrés de *C. elegans*

La privación de colesterol también ha sido relacionada con un decremento en el tamaño de *C. elegans*^{82,98} por lo que decidimos evaluar el aumento de tamaño durante el desarrollo larvario de nematodos silvestres y carentes de CUP-1. En medio complementado con colesterol no hay diferencias significativas en el crecimiento de los animales *cup-1(gk245)* y la cepa silvestre (Figura 11A). En condiciones de no complementación de colesterol hay una disminución significativa en la talla de ambas cepas, pero una vez más, la cepa *cup-1(gk245)* muestra una mayor disminución; de hecho, el crecimiento de esta cepa prácticamente se detiene al día 3 (Figura 11B) y una vez que son adultos (5to día) presentan una reducción de tamaño del 63% en comparación con la cepa silvestre (14,800 μm^2 vs 40,000 μm^2 respectivamente). A pesar de las diferencias de tamaño, al analizar por microscopía Nomarski las distintas etapas embrionarias (Figura 11C) y larvarias (Figura 11D), no observamos defectos o alteraciones visibles. Sin embargo, al cuantificar el desarrollo larvario, detectamos una disminución del 20% en el número de larvas L1 que llegan a ser adultos (Tabla 1).

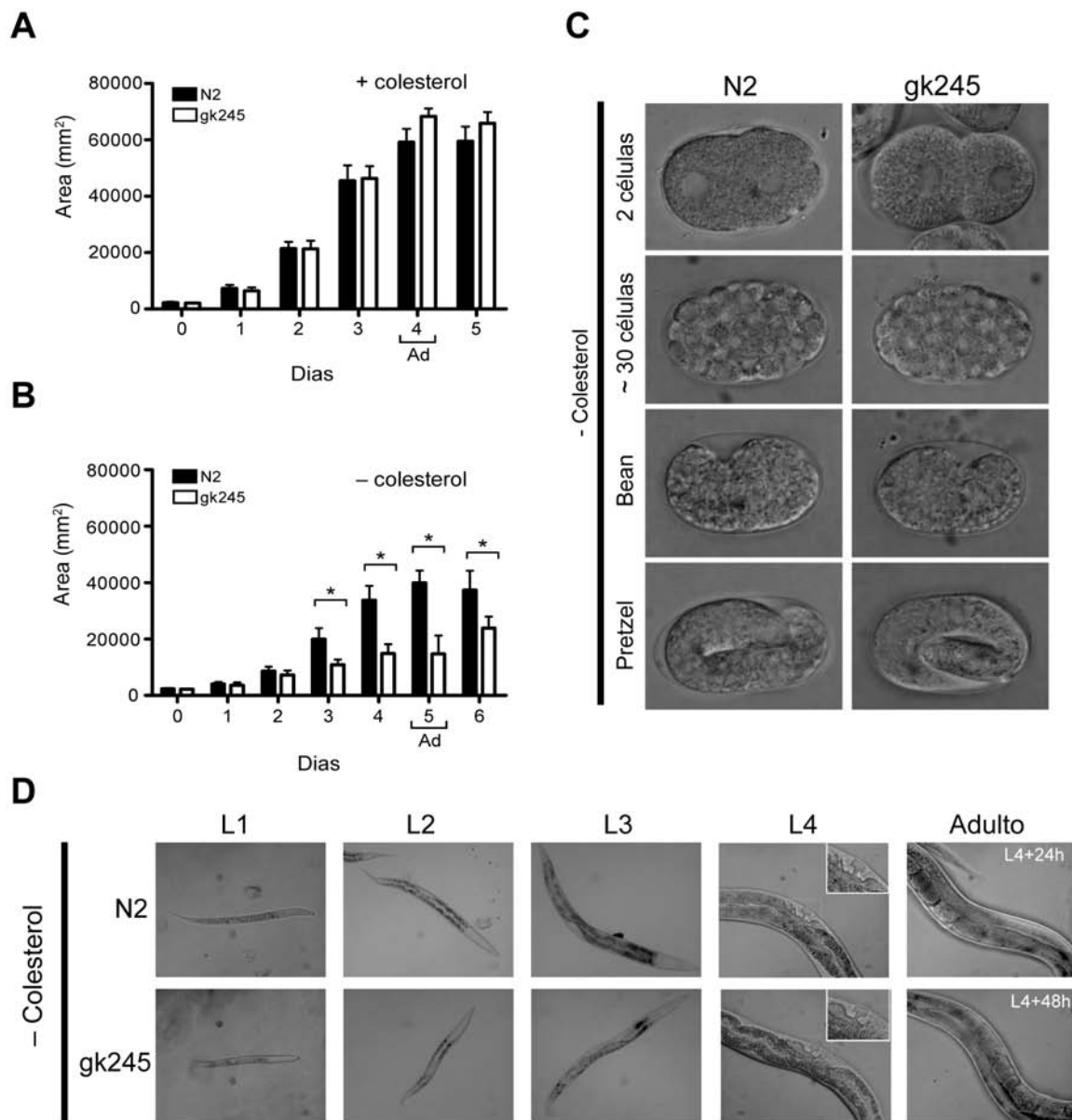


Figura 11. La ausencia de CUP-1 resulta en un mayor decremento del tamaño de *C. elegans* en condiciones carentes de colesterol. **(A y B)** El aumento de tamaño fue cuantificado de larvas L1 (día 0) hasta llegar a animales adultos (Ad) midiendo el área a partir de imágenes de gusanos silvestres y mutantes *cup-1(gk245)* en medio complementado con colesterol **(A)** u omitiendo éste **(B)**. Barra de error: error estándar, $n > 100$, * $p < 0.01$ en comparación con cepa silvestre. **(C y D)** Microscopia Nomarski de etapas representativas del desarrollo embrionario **(C)** y desarrollo larvario **(D)** de animales silvestres (N2) y mutantes CUP-1 (gk245) creciendo en ausencia de colesterol.

Alteraciones en el metabolismo de lípidos también han sido relacionadas en *C. elegans* con una pobre respuesta a contender con distintos tipos de estrés⁹⁹. Basados en esta evidencia nos dimos a la tarea de evaluar la resistencia de nemátodos silvestres y carentes de CUP-1 para sobrevivir a una temperatura de 35 °C. Como se observa en la figura 12A, la cepa *cup-1(gk245)* presenta una menor cuando esta crece en un medio no complementado con colesterol en comparación con la cepa silvestre en las mismas condiciones. Al evaluar la letalidad media (LM₅₀), observamos una reducción del 24% en los animales carentes de CUP-1 en comparación con los silvestres (4.7h vs 6.2h, respectivamente; Figura 12D). Interesantemente, en un medio complementado con colesterol, la cepa *cup-1(gk245)* también mostró una mayor sensibilidad a la temperatura con una reducción del 15% en comparación con la cepa silvestre (LM₅₀ de 6.4h vs 7.5h, respectivamente; Figura 12D).

La carencia de colesterol también a sido relacionada con problemas en la movilidad de *C. elegans*^{85,82,83} por lo que evaluamos la velocidad de gusanos silvestres y *cup-1(gk245)* creciendo con y sin colesterol. La cepa mutante de CUP-1 presento una reducción en la velocidad de su desplazamiento del 36% al crecer en un medio sin complementación de colesterol en comparación con la cepa silvestre (Figura 12B y 12D). Interesantemente, en el medio complementado con colesterol se observó una reducción similar: 39% más lentos los animales *cup-1(gk245)* en comparación con los N2 (Figura 12B y 12D). Estos datos indican que la reducción en la velocidad de la cepa *cup-1(gk245)* es independiente de la disponibilidad de colesterol en el medio. Para corroborar estos datos, se hicieron mediciones de velocidad en gusanos RNAi donde se había silenciado la expresión de CUP-1 (Figura 12C y 12D) observándose nuevamente una reducción del 33% en medio con colesterol y 40% en medio sin la complementación con éste.

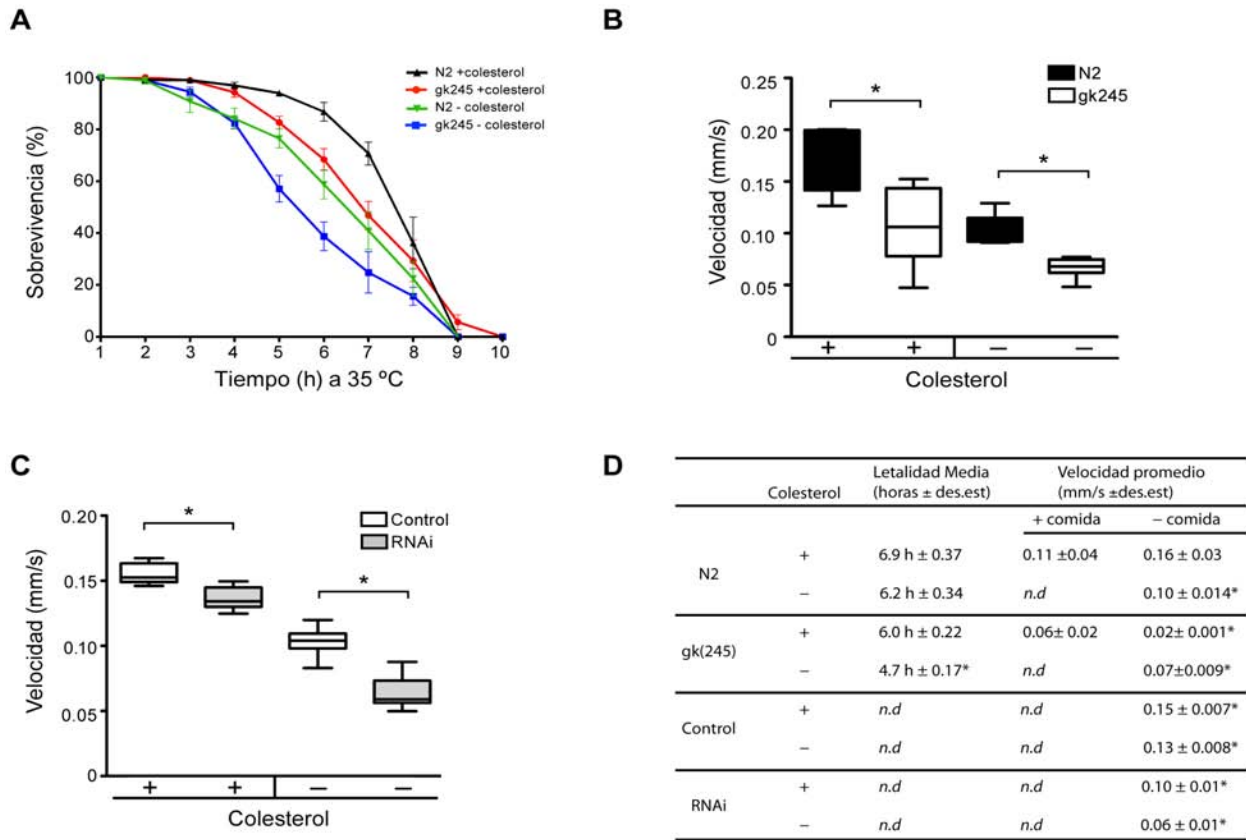


Figura 12. Alteraciones en la supervivencia y movilidad en animales carentes de CUP-1. (A) Los animales *cup-1(gk245)* son más sensibles al estrés calórico. La supervivencia de gusanos a 35 °C fue evaluada en la cepa silvestre (N2) y carentes de CUP-1 creciendo en medio complementado y sin complementar con colesterol. Barra de error: error estándar. (B) La velocidad está afectada negativamente en animales *cup-1(gk245)*. La velocidad de los gusanos fue estimada a partir de 10 minutos de video de animales crecidos con o sin complementación de colesterol. Cada barra abarca del primer al cuarto cuartil alrededor de la media. Barras de error: valor máximo y mínimo. $n > 300$ trayectorias individuales. (C) El silenciamiento de CUP-1 vía RNAi resulta en una disminución de la velocidad. La velocidad fue cuantificada de animales alimentados con un plásmido vacío (Control) o uno para silenciar vía RNAi la expresión de CUP-1 y luego transferidos a una caja sin comida para la videograbación. Cada barra abarca del primer al cuarto cuartil alrededor de la media. Barras de error: valor máximo y mínimo. $n > 300$ trayectorias individuales. (D) En la tabla se muestra la Letalidad media (tiempo al cual se observó el 50% de letalidad) y la velocidad promedio (mm/s) en las distintas condiciones. N2: cepa silvestre; *gk245*: carente de CUP-1; Control: animales alimentados con un plásmido vacío; RNAi: animales alimentados con un plásmido para silenciar la expresión de CUP-1. *n.d*: no determinado. * $p < 0.01$

Así pues, observamos que los animales carentes de CUP-1 se ven mayormente afectados ante la falta de colesterol en lo que respecta al tamaño, la y la velocidad. En conjunto esos datos apuntan a que CUP-1 es una proteína involucrada en el metabolismo de colesterol en *C. elegans*

4.4 La ausencia de CUP-1 repercute en la internalización de colesterol en *C. elegans*

Dado que los animales carentes de CUP-1 presentaron características similares a las observadas ante un decremento en los niveles de colesterol, nos preguntamos si estos fenotipos serían el resultado de una disminución en la capacidad de estos animales para internalizar colesterol proveniente del ambiente. Para contestar esta pregunta, nematodos silvestres y carentes de CUP-1 crecieron en un medio complementado con un análogo fluorescente de colesterol llamado NBD (Figura 13B) y su internalización y localización fue evaluada en la progenie adulta. Los nematodos silvestres presentaron una distribución a todo lo largo del cuerpo del gusano con un patrón punteado que asemeja vesículas intracelulares (Figura 13A, panel superior). Algunas zonas parecen tener una mayor incorporación de NBD como el tracto digestivo y la faringe. Otra zona rica en colesterol es observada en la cola, en una zona que podría corresponder al final de intestino. Esta distribución es similar a la previamente reportada usando filipina para teñir lípidos o el mismo NBD por otros autores⁷⁸. Al evaluar la fluorescencia de NBD en gusanos *cup-1(gk245)*, observamos una importante disminución en la captación de éste esteroide fluorescente (Figura 13A, panel inferior). Al cuantificar la densitometría del canal verde como indicativo de la cantidad de NBD internalizado, detectamos una disminución de 80% en los animales carentes de CUP-1 en comparación con los silvestres (Figura 13C). Una vez más, el silenciamiento de CUP-1 vía RNAi recapitula el fenotipo mutante: reducción del ~60% en los animales *cup-1(RNAi)* en comparación con los animales control (Figura 13C). Este dato corrobora que es la ausencia de CUP-1 la responsable del decremento en la fluorescencia de NBD.

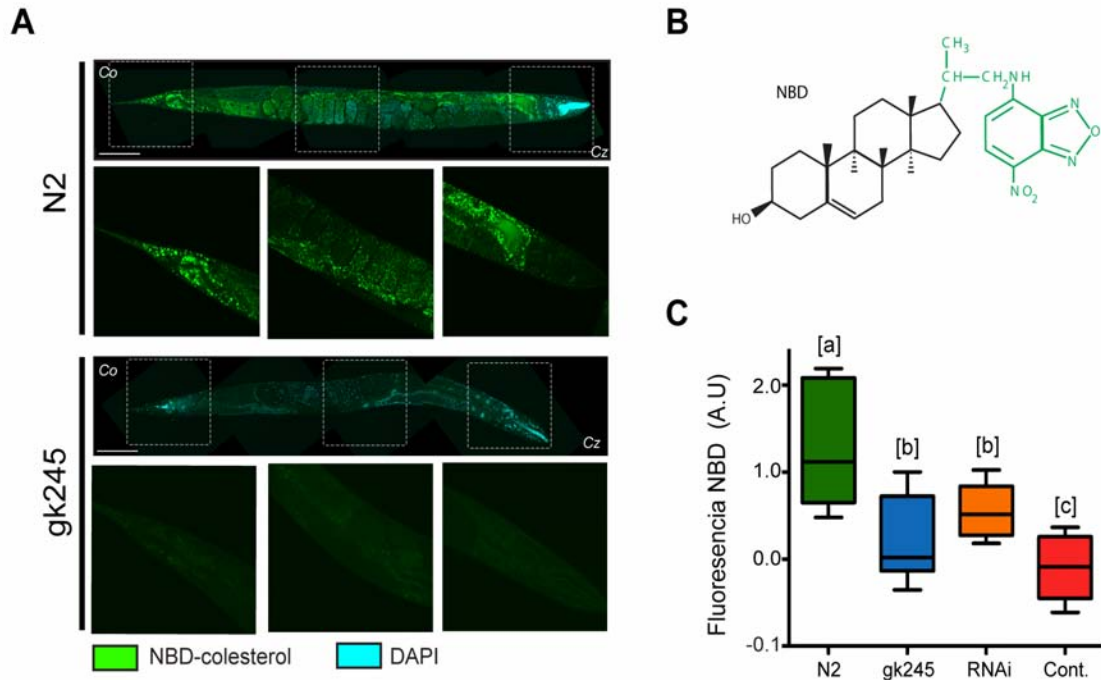


Figura 13. Disminución en la incorporación de NBD en gusanos carentes de CUP-1. (A) Nematodos silvestres (N2) y carentes de CUP-1 (*gk245*) fueron crecidos en presencia del análogo fluorescente de colesterol NBD. La incorporación de este compuesto fue evaluada mediante microscopía confocal en la F1 (canal verde). La señal del colorante nuclear DAPI se muestra en azul. Los rectángulos indican zonas ampliadas de la cola (*co*), sección media y cabeza (*cz*) de gusanos (solo canal verde). Barra de escala: 100 μ m (B) Estructura del NBD: 22-(*N*-(7-Nitrobecen-2-Oxa-1,3-Diazol-4-il)Amino)-23,24-Bisnor-5-Coles-3 β -Ol. En verde se muestra el fluoróforo que le confiere un pico de emisión a 530 nm y que por lo tanto, es detectado en el canal verde. (C) Densitometría del canal verde de gusanos silvestres (N2), *cup-1(gk245)* o alimentados con un plásmido para silenciar la expresión de CUP-1 (RNAi) crecidos en presencia de NBD. Cont: control de autofluorescencia basal observada en gusanos silvestres crecidos sin NBD que fue tomada como cero. Las barras representan del primer al tercer cuadril alrededor de la media de fluorescencia; barras de error: valor máximo y mínimo. Las letras diferentes ([a],[b],[c]) indican diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. A.U: unidades arbitrarias; $n > 20$ animales por condición.

Dado que el NBD está conjugado con un fluoróforo que podría alterar las propiedades biológicas de la molécula de colesterol, nos dimos a la tarea de evaluar la incorporación de colesterol tritiado [³H], cuyas propiedades bioquímicas son idénticas al colesterol no radioactivo. Para dicho fin, nematodos silvestres y carentes de CUP-1 fueron crecidos en presencia de [³H]-colesterol y la cantidad de radioactividad fue evaluada en la progenie. Una vez más, se observó un decremento en la incorporación de colesterol radioactivo en los animales *cup-*

1(*gk245*) que en comparación con el control mostraron una reducción de aproximadamente del 50% en la marca radioactiva incorporada (Figura 14A). Estos datos corroboran lo previamente observado cuantificando la fluorescencia de NBD y sugieren fuertemente que CUP-1 podría estar involucrado con la incorporación de colesterol en *C. elegans*.

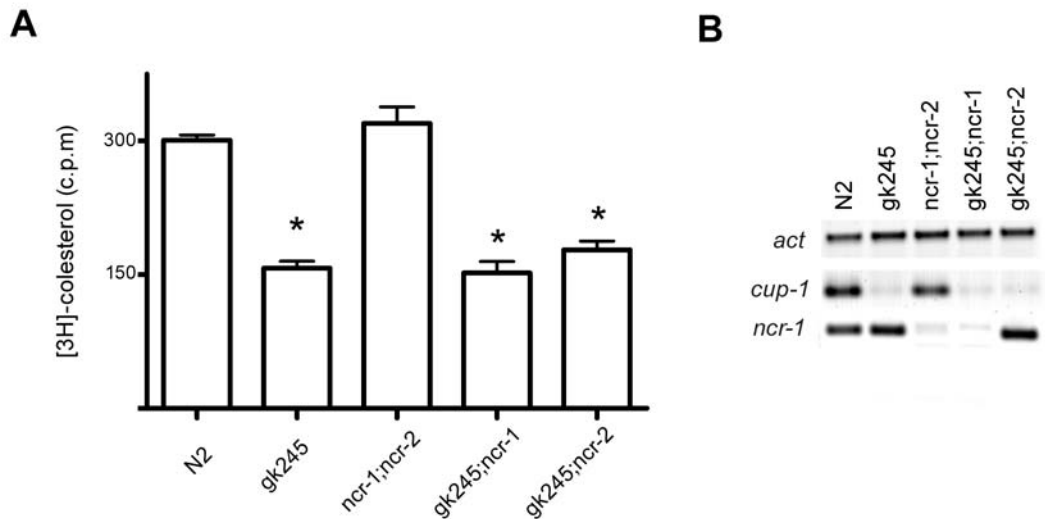


Figura 14. La incorporación de colesterol radioactivo solo se ve afectada ante la ausencia de CUP-1. (A) La incorporación de ^3H -colesterol (cuentas por minuto) fue cuantificada en la progenie de animales silvestres (N2), carentes de CUP-1 (*gk245*) y en las dobles mutantes: *ncr-1;ncr-2*, *gk245;ncr-1* y *gk245;ncr-2*. Barras de error: error estándar, * $p < 0.01$; $n > 300$ gusanos. **(B)** RT-PCR para corroborar la ausencia de los RNA mensajeros de *cup-1* y *ncr-1* en las distintas cepas evaluadas. Como control positivo se amplificó el gen de actina (*act*).

Para complementar los estudios de incorporación de ^3H -colesterol decidimos evaluar la incorporación de colesterol radioactivo en animales carentes de dos proteínas que han sido propuestas como mediadoras del transporte intracelular de colesterol en *C. elegans*: NCR-1 y NCR-2. Dichas proteínas también tienen posibles dominios CRAC en sus secuencias, además se ha reportado que *ncr-1* es expresado en el intestino y en zonas ricas en colesterol⁸⁸. Adicionalmente, para descartar la redundancia entre CUP-1 y las dos proteínas NCR, se generaron animales dobles mutantes entre *ncr-1* y *ncr-2* con *cup-1*. Los animales mutantes *ncr-1;ncr-2* presentaron una entrada de colesterol similar a la observada en animales silvestres (FIG 14A) mientras que las dobles

mutantes con CUP-1 presentaron una incorporación similar a las mutantes simples de CUP-1. Este resultado sugiere que sólo CUP-1 está involucrado en la incorporación de colesterol del ambiente y corrobora la noción de que tanto NCR-1 como NCR-2 sólo están involucrados con el escape de colesterol endocitado de los endosomas/lisosomas⁹⁰.

4.5 La expresión de CUP-1 concuerda con zonas ricas en colesterol en *C. elegans*

Para caracterizar las zonas de expresión del gen *cup-1* se empleó una cepa que expresa a GFP bajo el promotor de *cup-1*. La expresión de GFP en estos nematodos se localiza principalmente a lo largo del sistema digestivo, (Figura 15A): hay una señal positiva en la faringe, la *válvula faringo-intestinal* y el intestino, incluso la señal positiva de GFP abraza la parte posterior en la cola del nemátodo. También se observa señal de GFP en ovocitos, aunque este dato hay que tomarlo con reserva pues algunos autores han observado incorporación inespecífica de GFP en ovocitos proveniente de otras estructuras como la cavidad pseudocolematida¹⁰⁰. Para corroborar que las zonas de expresión de *cup-1* son estructuras ricas en colesterol, estos gusanos GFP+ fueron crecidos en presencia de DHE (Figura 15B), un análogo fluorescente de colesterol que se encuentra de manera natural en algunos organismos¹⁰¹ y que se ha demostrado experimentalmente su capacidad para substituir las necesidades de esteroides de *C. elegans*.⁷⁸ En la Figura 15A se muestra como las células intestinales positivas para GFP son también positivas para DHE.

La incorporación de colesterol ha sido reportada a todo lo largo de la vida de los gusanos^{78,79}, por lo que nos dimos a la tarea de caracterizar la expresión de *cup-1* durante las distintas etapas del desarrollo larvario de *C. elegans*, para esto se amplificó el RNA mensajero de *cup-1* en las distintas etapas larvarias detectándose la expresión de *cup-1* desde la primera etapa larvaria (L1) hasta el adulto.

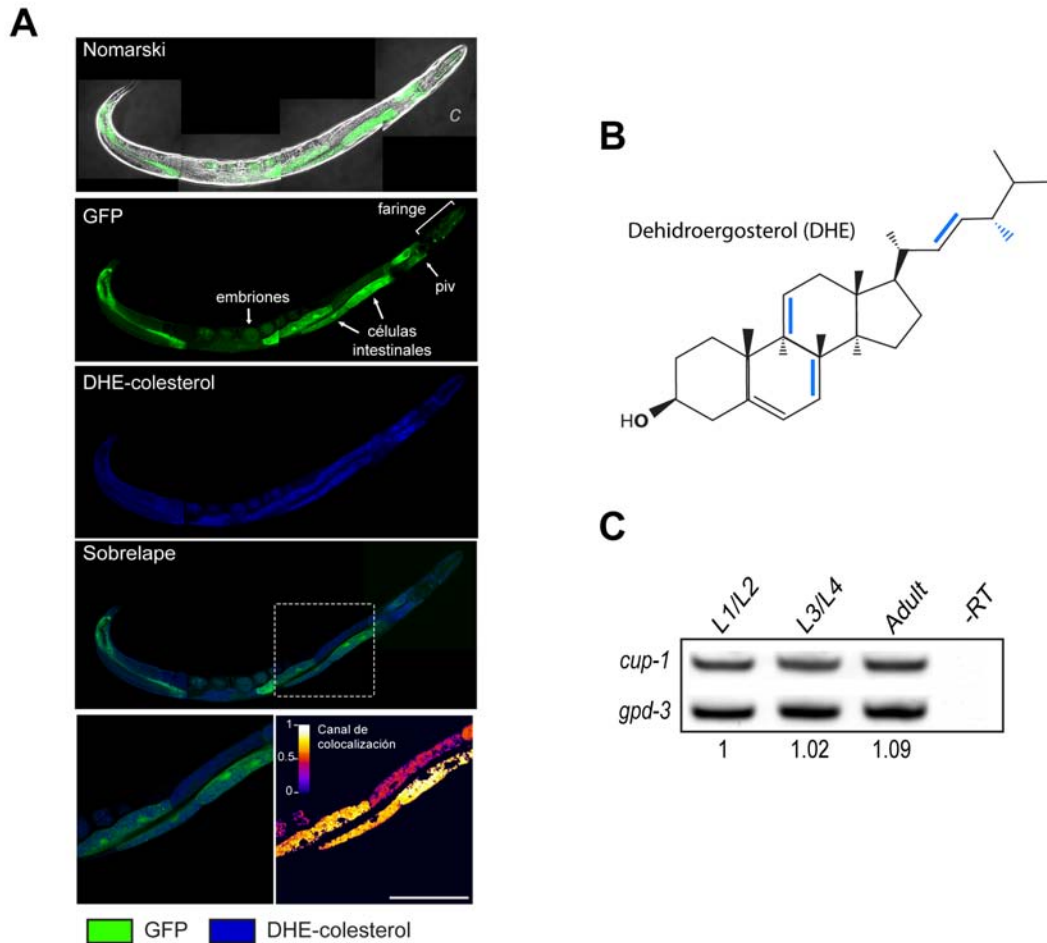


Figura 15. La expresión de CUP-1 en *C. elegans* corresponde a zonas ricas en colesterol. (A) La cepa de BC12913 (GFP bajo el promotor de *cup-1*) creció en presencia del colesterol fluorescente azul DHE y la colocalización entre ambas señales fue evaluada mediante microscopía confocal. El panel superior muestra la imagen Nomarski sobrelapada con el canal verde. La expresión de GFP se observa en la faringe, en la “*válvula faringo-intestinal*” (*piv*) y en células intestinales (flechas). La señal de DHE se muestra en azul. El rectángulo indica una zona ampliada del intestino que se presenta en el panel inferior izquierdo. Un canal de colocalización (abajo derecha) fue construido a partir de píxeles positivos de ambos canales. *c*: cabeza. Barra: 50 μm **(B)** Estructura del Dehidroergosterol. En azul se muestran los dobles enlaces adicionales a la molécula de colesterol que le confieren sus propiedades fluorescentes. **(C)** RT-PCR de *cup-1* en distintas etapas larvares y adultos. Los números indican la cantidad de mensajero de *cup-1* normalizado por densitometría en comparación con el mensajero de *gpdh* (*gpd-3*) de larvas L1/L2 (tomado como 1). -RT: control sin transcriptasa reversa.

4.6 Localización subcelular de CUP-1::GFP en membrana plasmática, RE, endosomas y lisosomas

Para profundizar la caracterización de CUP-1, decidimos explorar su localización subcelular, para dicho fin, generamos una proteína quimérica fusionando a la proteína verde fluorescente (GFP) al carboxilo terminal de CUP-1. A esta proteína quimérica se le denominará en lo subsecuente como CUP-1::GFP. Esta proteína fue expresada transitoriamente en la línea celular de mamífero HEK293 FT (“*human embryonic kidney cells FT*”) que se caracteriza por sus altos niveles de transfección y expresión de proteínas exógenas.

Mediante microscopia confocal de células vivas se observó que CUP-1::GFP presenta una localización subcelular en una estructura que podría corresponder al RE además de estructuras similares a vesículas (Figura 16, canal 1). Para corroborar dichas observaciones se emplearon distintos marcadores subcelulares. En la Figura 16A se muestra que la señal de CUP-1::GFP colocaliza con el marcador de RE *ER-tracker*. Para cuantificar el grado de colocalización entre ambas señales se calculó el Coeficiente de Colocalización de Manders¹⁰² (R). Este valor es una estimación del grado de colocalización entre dos fluoróforos. Aunque una colocalización perfecta tendría un valor de $R = 1$, el valor de R no es cuantitativo en el sentido que un valor mayor no es necesariamente indicativo de una mayor colocalización, pero un valor positivo sí es indicativo de una colocalización positiva. En el caso de la colocalización entre CUP-1::GFP y ER-tracker, se obtuvo un valor positivo de R (0.53) indicando que hay una colocalización positiva entre CUP-1 y el RE. Los coeficientes de colocalización de Manders también fueron calculados entre CUP-1::GFP y el marcador de membrana plasmática FM4-64 (Figura 16B) con un valor de $R = 0.47$, endosomas (Figura 16C), $R = 0.91$ y de lisosomas (Figura 16D), $R = 0.84$. Adicionalmente, mediante una inmunocitoquímica, se observó colocalización y valores positivos de R entre CUP-1::GFP y el aparato de Golgi (Figura 16E).

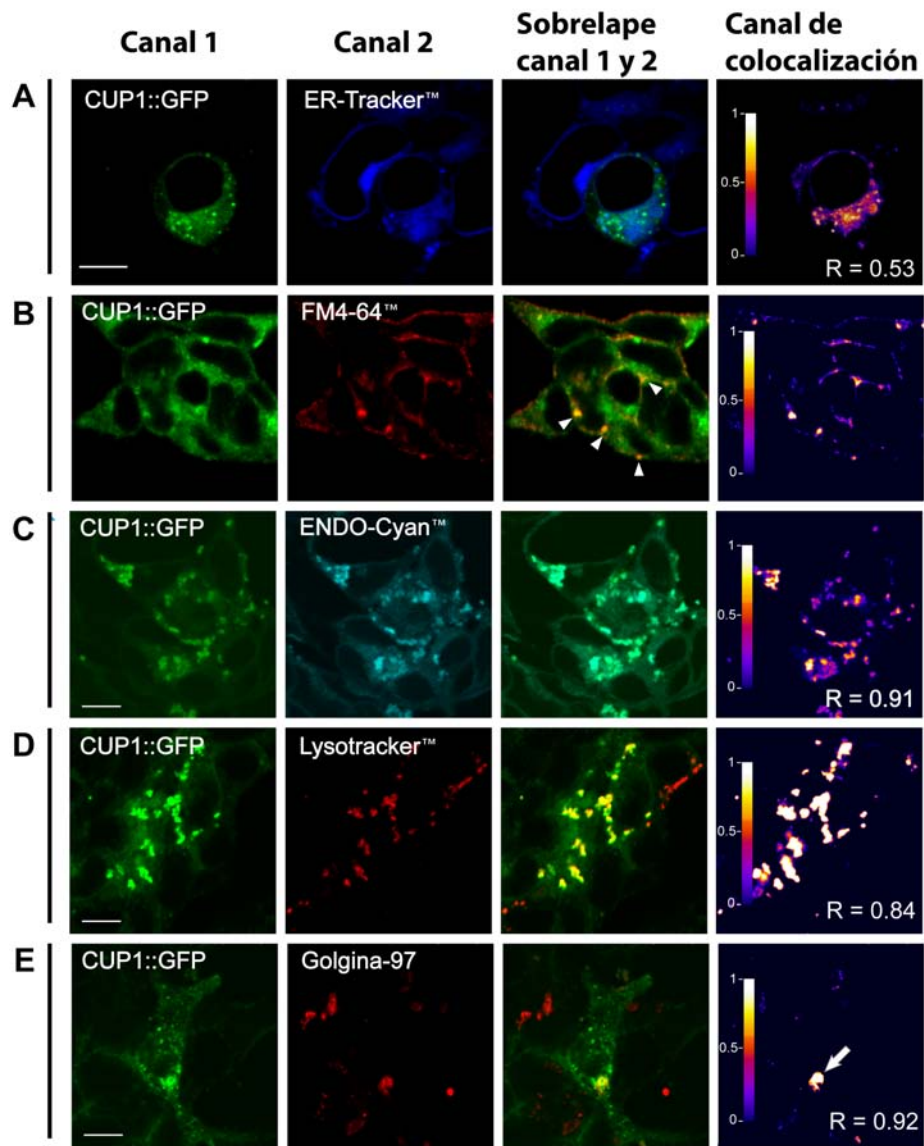


Figura 16. Localización subcelular de CUP-1::GFP en células HEK293 FT. La colocalización de CUP-1::GFP y marcadores de organelos celulares fue evaluada mediante microscopia confocal de células vivas. El canal de colocalización fue construido a partir de los valores PDM superiores al promedio en los canales 1 y 2. A la imagen resultante se le aplicó una tabla de pseudocolor LUT RedFire para mayor claridad. **(A)** Colocalización de CUP-1::GFP y el marcador de retículo endoplásmico ER-tracker (azul). **(B)** La colocalización entre CUP-1::GFP y el marcador lipofílico de membrana FM4-64 (rojo) se observa en la membrana plasmática y estructuras vesiculares similares a endosomas (flechas blancas). Estas estructuras similares a endosomas también colocalizan con el marcador de endosomas tempranos rho-GTPasa en color cian **(C)** y el marcador de lisosomas red-Lysotracker **(D)**. **(E)** La inmunotinción en células fijadas usando el anticuerpo anti Golgina-97 humana (rojo) mostró una colocalización positiva con el aparato de Golgi (flecha). R: Coeficiente de Colocalización de Manders. Barra de escala 10 μm .

Además de calcular los coeficientes de Manders, se generó un *Canal de Colocalización* (Figura 16, última columna) donde se muestran solo los pixeles con valores positivos de PDM (Producto de Diferencias de la Media de fluorescencia)^{††*}. Esta imagen muestra los pixeles que están por arriba de la media de fluorescencia en ambos canales, de tal manera que solo sean visibles los pixeles “confiablemente” positivos y por lo tanto es una imagen confiable de la colocalización.

Dado que las vesículas de CUP-1::GFP asemejan a las vesículas de colesterol NBD previamente observadas en nemátodos (ver Figura 13A), nos preguntamos si estas vesículas colocalizarían con el colesterol azul DHE. Para dicho fin, células CUP-1::GFP fueron incubadas en medio con DHE y la colocalización de estos fue evaluada por microscopia confocal. Como se observa en la Figura 17A, se observan valores positivos de R (0.82) y una colocalización positiva entre las vesículas de CUP-1::GFP y la señal del DHE.

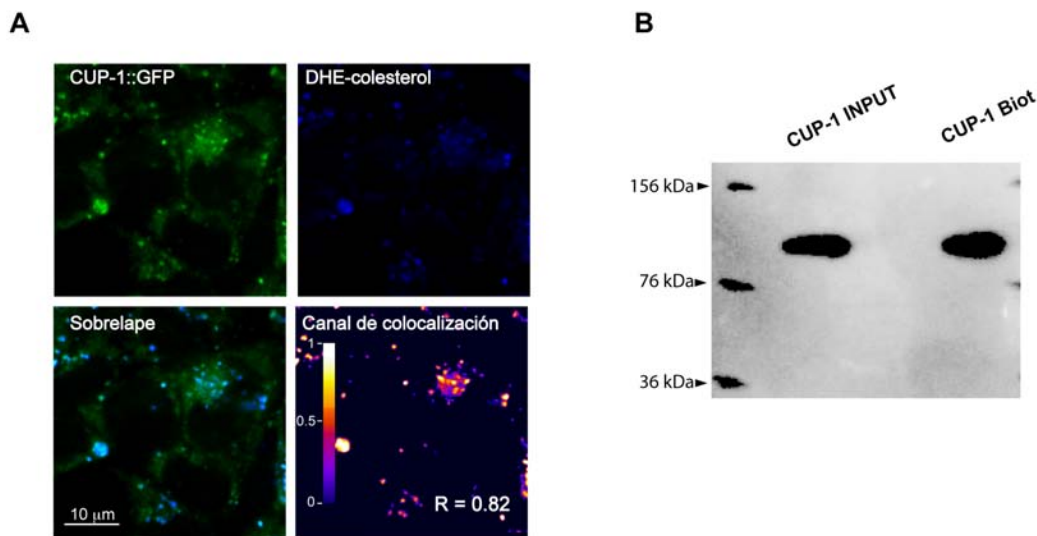


Figura 17. CUP-1::GFP colocaliza con vesículas de colesterol y esta en membrana plasmática. (A) Microscopia confocal de células HEK293 FT expresando CUP-1::GFP (verde) incubadas con DHE (azul). Se muestra el canal de colocalización y el valor del Coeficiente de Colocalización de Manders (R). **(B)** Western blot anti GFP donde se detecta la presencia de CUP-1::GFP tanto en la fracción total (Input) como en la fracción de proteínas de membrana purificadas mediante biotilación inespecífica (Biot). Tamaño esperado de CUP-1::GFP: ~117 kDa.

* Para cada pixel, PDM = (intensidad canal 1 – intensidad media canal 1) x (Intensidad canal 2 – intensidad media canal 2)

Aunque los estudios de microscopia confocal y los coeficientes de Manders son útiles para estimar la colocalización entre proteínas, decidimos confirmar la presencia de CUP-1 en la membrana plasmática por un método bioquímico. Para dicho fin, se biotinilaron de manera inespecífica todas las proteínas de membrana de células HEK293 FT transfectadas con CUP-1::GFP. Posteriormente, estas proteínas biotiniladas fueron purificadas y separadas en un gel de poliacrilamida. Dado que no se cuenta con anticuerpos específicos contra CUP-1, se utilizó un anticuerpo dirigido contra GFP para detectar a CUP-1::GFP en la fracción de proteínas biotiniladas (Figura 17B) Ese resultado corrobora que al menos, una fracción de CUP-1 se encuentra en la membrana plasmática de las células.

4.7 Interacción entre CUP-1::GFP y DHE medida por FRET

Cuando el espectro de emisión de un fluoróforo se sobrelapa con el espectro de excitación de un segundo fluoróforo (Figura 18A), es posible evaluar la transferencia de energía del fluoróforo de menor espectro de emisión al fluoróforo de mayor espectro de emisión. Dicho fenómeno se conoce como FRET, por sus siglas en inglés *“Förster/Fluorescent Resonance Energy Transfer”*¹⁰³. El FRET es un excelente indicador de cercanía entre dos moléculas ya que sólo ocurre si los fluoróforos están a una distancia igual o menor a 10 nm¹⁰⁴ (Figura 18B y 18C). Dado que el DHE y la GFP tienen espectros de emisión y excitación que se sobrelapan (Figura 18A), decidimos evaluar si había un fenómeno FRET entre estas dos moléculas.

Para cuantificar y corroborar el FRET, se siguió el protocolo de “blanqueo del aceptor”¹⁰⁵ (Figura 18D). Dicho protocolo se basa en fotoblanquear de manera específica la molécula aceptora (en este caso GFP) para que al eliminarla, se recupere la emisión del fluoróforo donador (en este caso el DHE). Sí se observa este incremento en la fluorescencia del donador DHE después del fotoblanqueo de la GFP, se considera como un fuerte indicativo de que ambas moléculas estaban a una distancia menor de 10 nm y se puede suponer su interacción.

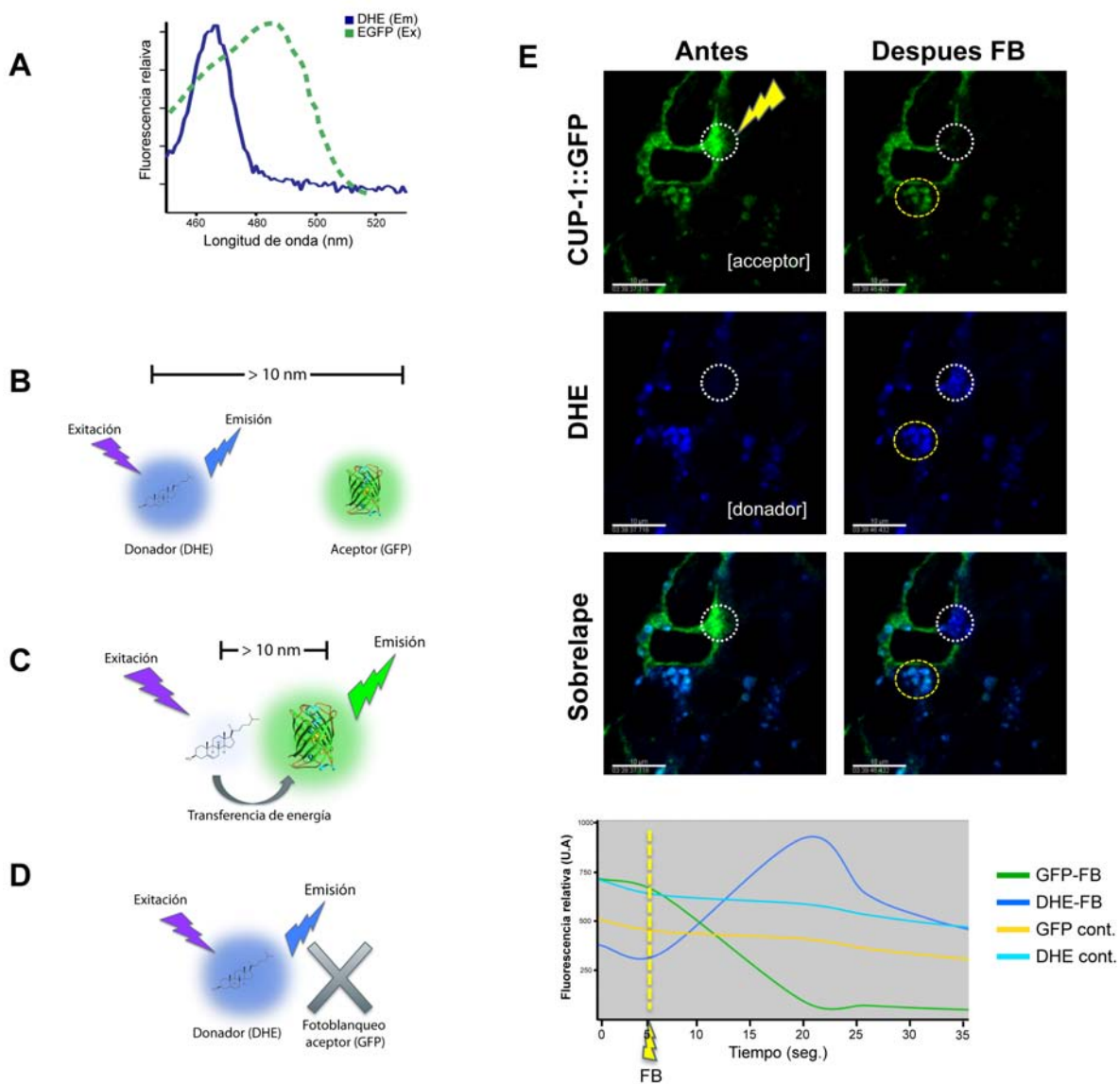


Figura 18. Transferencia de energía tipo FRET entre CUP-1::GFP y el colesterol fluorescente azul DHE. (A) Sobrelape entre el espectro de emisión del DHE (azul) a 405 nm y el espectro de excitación de la GFP (verde). **(B)** Si se excita al fluoróforo donador DHE y la distancia con el fluoróforo aceptor es mayor a 10 nm, se detectará la emisión de DHE. **(C)** FRET. Si la distancia entre los fluoróforos es menor a 10 nm, ocurre una transferencia de energía tipo FRET detectándose la fluorescencia del aceptor GFP. **(D)** Fotoblanqueo del aceptor. Para corroborar el fenómeno FRET, se blanquea al aceptor (GFP) recuperándose la emisión del donador (DHE). **(E)** Imagen representativa de una célula HEK293 transfectada con CUP-1::GFP e incubada con DHE antes y después del fotoblanqueo de la GFP. El círculo blanco muestra el área fotoblanqueada. El círculo amarillo muestra una zona no fotoblanqueada que se tomó como control. Barra de escala 10 μm . En la grafica inferior se muestra la cuantificación de la fluorescencia respecto al tiempo de la GFP y el DHE de la zona fotoblanqueada (FB) y control (cont.). La línea amarilla muestra el momento del fotoblanqueo de la GFP.

Al implementar este protocolo en células CUP-1::GFP incubadas con DHE, observamos un incremento en la señal del DHE en una zona donde la GFP fue fotoblanqueada (Figura 18E). Como control, en una zona en la misma célula donde no se llevó a cabo el fotoblanqueo, sólo se observa el decaimiento natural de ambas moléculas (Figura 18E, panel inferior). El incremento en la fluorescencia del DHE puede ser evaluado y empleado para calcular la eficiencia de FRET^{105,106} ✦. Al cuantificar la eficiencia de FRET entre CUP-1::GFP y DHE, ésta resultó en un promedio de 28% (Figura 19B), indicativo de una interacción directa entre estas dos moléculas en las vesículas de colesterol.

Dado que CUP-1 tiene al menos dos motivos CRAC conservados (Anexo II), quisimos evaluar (mediante FRET) el involucramiento y funcionalidad de éstos dominios en la unión al colesterol fluorescente DHE. Para esto, se generaron dos proteínas mutantes substituyendo el aminoácido tirosina por glicina en el dominio CRAC extracelular (Y126) y en el dominio CRAC transmembranal (Y576) (Figura 19A). Se ha reportado que esta substitución imposibilita la interacción del dominio CRAC con el colesterol. Adicionalmente se generó una proteína incluyendo ambos cambios. La mutagénesis del dominio transmembranal resultó en una eficiencia de FRET del 16.8%, que en comparación con la proteína silvestre (28%) es una reducción del 40% (Figura 19B). Por su parte, mutagenizar el dominio CRAC extracelular resultó en una eficiencia de FRET del 22%, sin embargo el análisis estadístico reveló que no hay diferencias estadísticamente significativas con el dominio silvestre (Figura 19B). Este resultado era esperado pues la GFP y el dominio CRAC extracelular están en lados opuestos de la membrana plasmática imposibilitando el FRET. Como era de esperarse, la doble mutante tiene una eficiencia de FRET similar a la mutante simple transmembranal (18%), confirmando que sólo el dominio CRAC transmembranal está participando en el FRET. Estos datos corroboran que existe una interacción directa entre el análogo de colesterol DHE y -al menos- el dominio CRAC transmembranal.

✦ Eficiencia de FRET= $(D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}) / D_{\text{post}}$ | D = Intensidad de fluorescencia del donador DHE; pre/post fotoblanqueo de la GFP

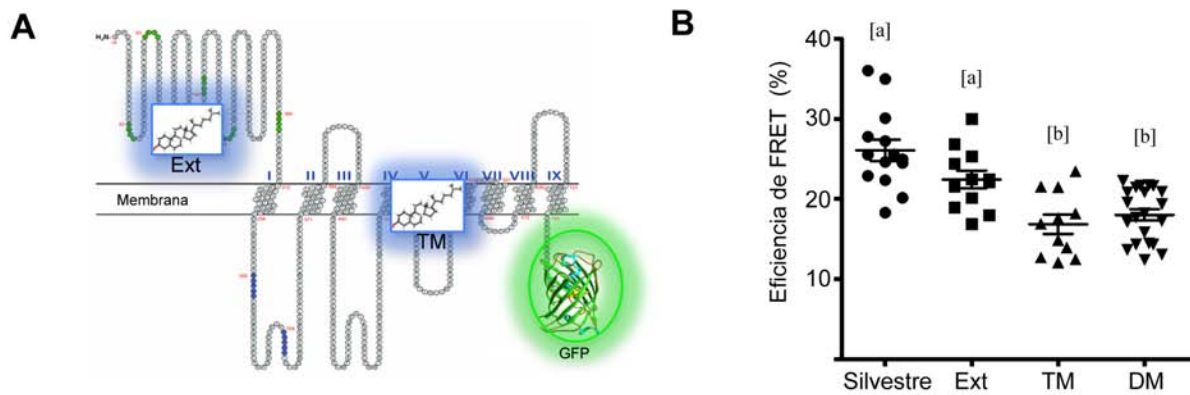


Figura 19. Interacción directa entre DHE y el dominio CRAC transmembranal evaluada por FRET. (A) Esquema de la proteína quimérica CUP-1::GFP donde se muestran los dominios CRAC mutagenizados: Ext: CRAC extracelular; TM: CRAC transmembranal. **(B)** Cuantificación de la Eficiencia de FRET después del fotoblanqueo del aceptor GFP en: la proteína quimérica con los dominios CRAC intactos (silvestre) o mutagenizados: Ext, TM, y doble mutante DM. Cada punto indica una medición. Las letras diferentes ([a] y [b]) indican diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. Barra: media \pm error estándar.

4.8 Las proteínas homólogas, SIDT1 y SIDT2 poseen dominios CRAC conservados y no están involucradas en el RNAi

El análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de CUP-1 reveló que existen posibles proteínas homólogas en genomas de distintos organismos (Figura 20A). En mamíferos identificamos dos clados, posiblemente debido a una duplicación genética, a estos genes se les nombró como SIDT1 y SIDT2 puesto que, hasta la publicación de este trabajo, su homólogo más cercano era SID-1 de *C. elegans*, un proteína capaz de mediar la translocación de RNA de doble hebra (dsRNA) de una célula a otra y por tanto responsable del efecto sistémico del RNA de interferencia (RNAi) observado en nematodo. Sin embargo, un análisis cuidadosos del porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos, claramente muestra que lo supuestos genes homólogos a SID-1, en realidad comparten una mayor homología con CUP-1: en promedio 16.5% vs 31.5%, respectivamente (Figura 20A).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos reveló la presencia de motivos CRAC conservados en SIDT1 y SIDT2: uno en la sección extracelular y otro en un cruce transmembranal (Figura 20B y Anexo II). Cabe recalcar que SID-1 no tiene dominios CRAC

conservados. En lo que respecta a la identidad a nivel de aminoácidos entre CUP-1 y SID-1 es de apenas 16% (Figura 20A), lo cual está por debajo del límite para suponer homología funcional. Por lo mismo, no resultó extraño que tanto nosotros (Anexo I), como otro grupo de investigadores¹⁰⁷, observáramos que la ausencia de CUP-1 no afecta la capacidad de los gusanos para llevar a cabo un efecto sistémico del RNAi.

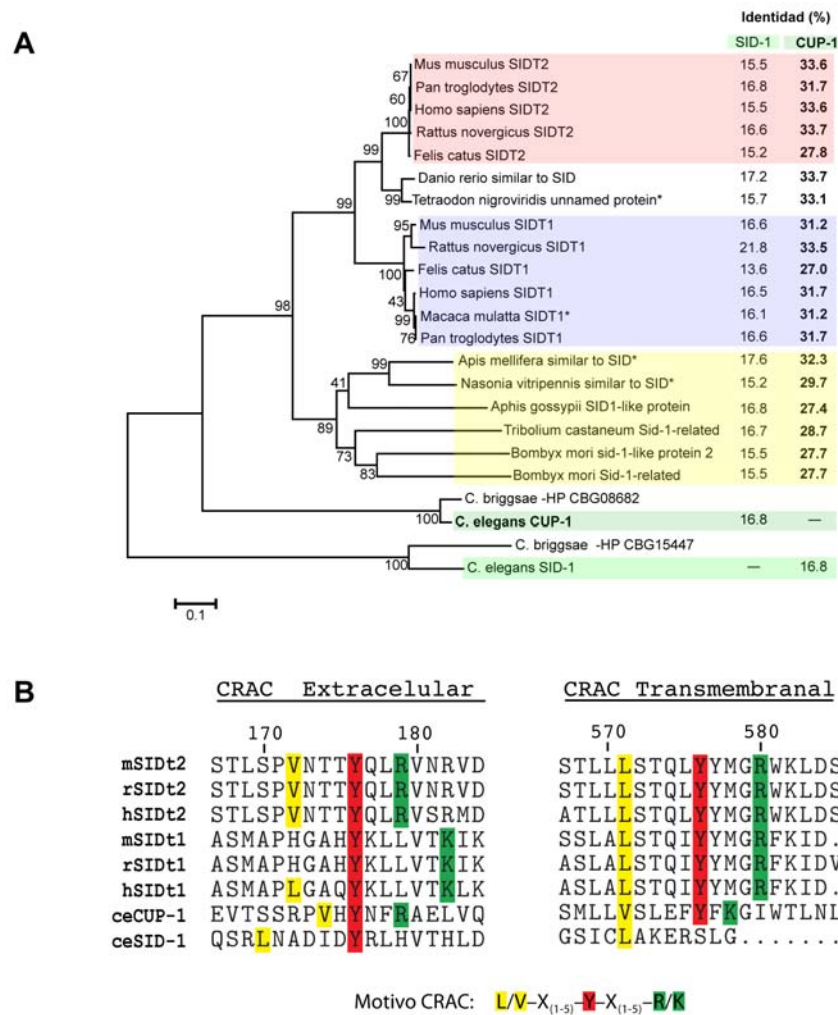


Figura 20A. Análisis filogenético de los homólogos de CUP-1. (A) El alineamiento múltiple de secuencias (ClustalW) fue empleado para generar un árbol filogenético por el método de máxima similitud usando el modelo WAG de sustitución de aminoácidos. El porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de cada proteína en comparación con SID-1 y CUP-1 es presentado a la derecha del árbol. Los números en las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap*. (B) Alineamiento de los motivos CRAC conservados en CUP-1 y sus homólogos. Los números indican la posición de amino ácidos en CUP-1. m: *Mus musculus*; r: *Rattus norvegicus*; h: *Homo sapiens*; ce: *Caenorhabditis elegans*.

A pesar de la baja homología entre SID-1 y los genes de mamíferos, decidimos evaluar experimentalmente la capacidad de las proteínas hSIDT1 (humano) y mSIDT2 (ratón) para mediar la internalización de dsRNA. Para dicho fin, ambas proteínas fueron clonadas y expresadas transitoriamente en dos líneas celulares humanas: HEK293 FT (riñón embrionario) y PANC1 (adenocarcinoma de ducto pancreático) además de la línea celular de *Drosophila* S2 (Schneider 2); en esta línea celular de insecto se demostró la funcionalidad de SID-1 como un posible canal de dsRNA¹⁰⁸. Sin embargo, la expresión de hSIDT1 o mSIDT2 en las distintas líneas celulares no tiene ningún efecto en la capacidad de las células para internalizar una mayor cantidad de dsRNA marcado radioactivamente (Figuras 12A-C). Sólo la expresión de SID-1 es capaz de mediar la entrada de dsRNA al interior de las mismas.

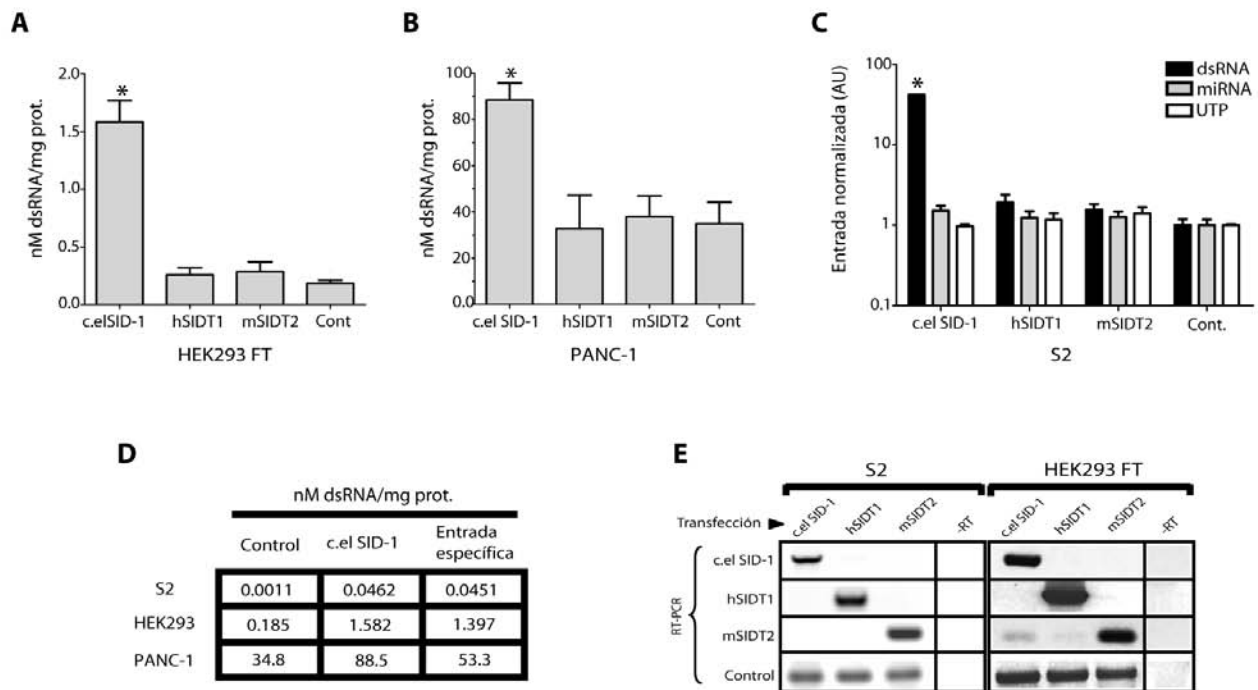


Figura 21. La expresión exógena de hSIDT1 o mSIDT2 no aumenta la internalización de dsRNA. (A) Células HEK293 FT o (B) PANC-1, fueron transfectadas transitoriamente con SID-1 de *C.elegans* (control positivo), hSIDT1 (humano), mSIDT2 (ratón) o GFP (control negativo) y posteriormente incubadas con 5 µg/mL de dsRNA (700nt) marcado radioactivamente por una hora a 37 °C. La molaridad del dsRNA fue calculada a partir de la secuencia del RNA normalizado respecto a la cantidad de proteína de cada muestra. Barra de error: desviación estándar, $n > 5$ * $p < 0.01$. (C) Células S2 de *Drosophila* incubadas con: dsRNA (700nt), miRNA (pre-let-7A) o el equivalente en c.p.m de ³²P γ-UTP por 4h a 26 °C. La internalización fue normalizada por la cantidad de proteína de cada muestra y luego al valor basal de entrada de cada condición. (D) La entrada específica vía SID-1 (en nanomoles de dsRNA) fue calculada restando la entrada basal de las células control a la entrada en las células transfetadas con SID-1. Los valores fueron normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. (E) RT-PCR para confirmar la expresión de los transgenes después de la transfección de las células. Los genes de actina de insecto o GAPDH humano fueron usados como controles respectivamente. -RT: control sin transcriptasa reversa.

Dado que en mamíferos los dsRNAs endógenos son los micro RNAs (miRNAs), decidimos evaluar la internalización de pre-Let7a y como control, UTP libre, pero en ningún caso detectamos internalización por arriba del la entrada basal. Ni siquiera en las células que expresaban a SID-1 internalizaron al miRNA, lo que es un dato novedoso que nos habla de la especificidad de esta proteína para dsRNA grandes (Figura 21C). Interesantemente, observamos que la internalización específica de dsRNA mediada por SID-1 es mayor en las células de insecto: 42 veces más que el control, a pesar de ser las que menos dsRNA internalizan medido en nM de dsRNA (Figura 21D). Por su parte, las células PANC-1, a pesar de ser las células que más dsRNA captan, al sobreexpresar a SID-1 sólo internalizan 2.5 veces más que el basal (Figura 21D). Estos datos podrían sugerir que la entrada mediada por SID-1 es independiente de las vías endógenas de internalización de dsRNA.

4.9 Localización subcelular de hSIDT1 y mSIDT2 y su interacción con DHE medida por FRET

Para caracterizar la expresión subcelular de hSIDT1 y mSIDT2, se generaron proteínas quiméricas fusionando a la GFP en el carboxilo terminal de estas proteínas y su localización subcelular fue evaluada mediante marcadores específicos de organelos y microscopia confocal. Ambas proteínas quiméricas presentaron un patrón similar: la mayor parte se localiza intracelularmente colocalizando con un marcador de RE (Figura 22A). Dada la naturaleza hidrofóbica de estas proteínas y los 10 segmentos transmembranales predichos, suponemos que estarán insertadas en la membrana de este organelo. También se observa un particular enriquecimiento en el Aparato de Golgi el cual fue corroborado mediante una inmunotinción anti-golgina97 (Figura 22B). Además de la localización en RE, ambas proteínas se observan distribuidas en vesículas. Algunas de estas colocalizan con un marcador específico de lisosomas (Figura 22C) lo que concuerda con la identificación de señales involucradas en el direccionamiento a lisosomas en tanto en SIDT1 como en SIDT2 (Anexo II).

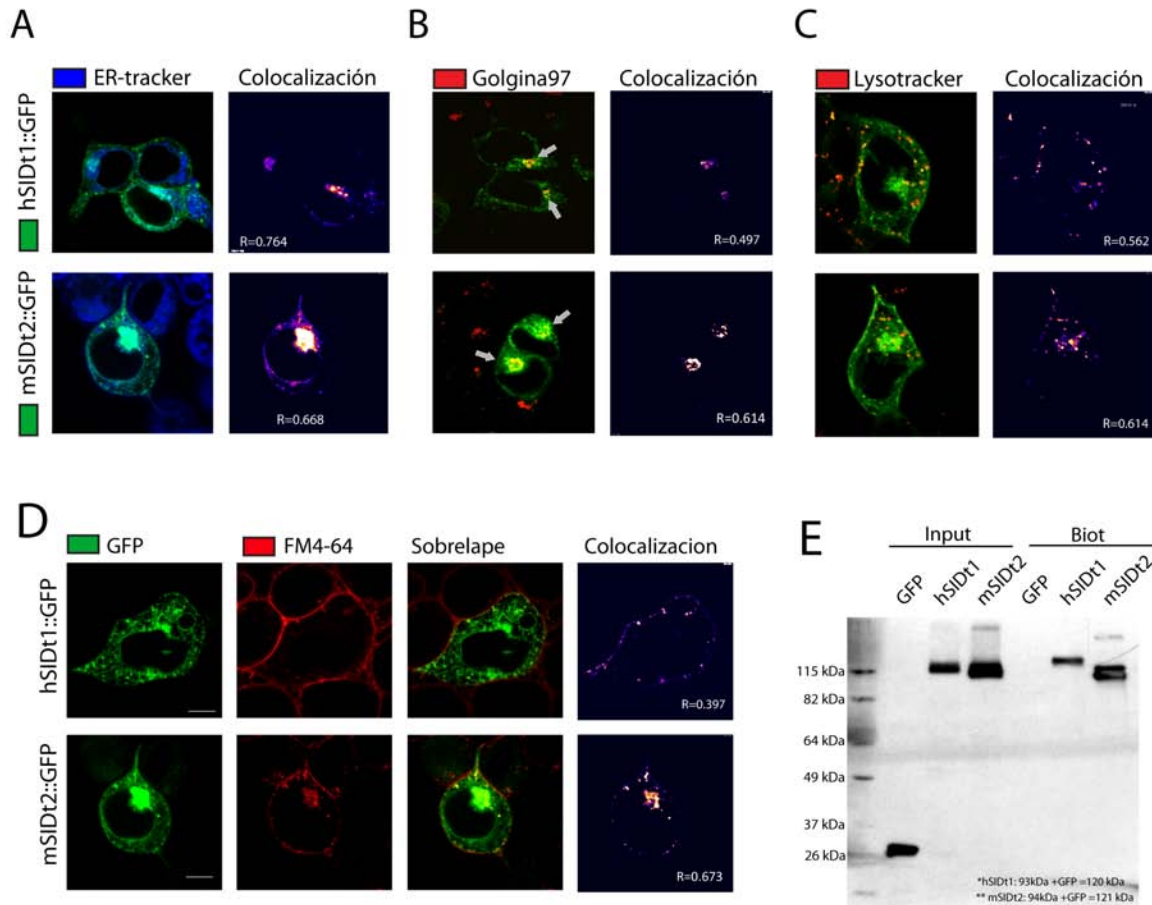


Figura 22. hSIDT1 y mSIDT2 se localizan en organelos membranosos y en membrana plasmática. Microscopía confocal de líneas celulares (HEK293FT) que expresan establemente a las proteínas quiméricas hSIDT1::GFP o mSIDT2::GFP incubadas con **(A)** el marcador de retículo endoplásmico ER-Tracker azul, **(C)** el marcador de lisosomas Lysotracker-red o **(D)** el marcador lipofílico de membrana plasmática FM4-64. **(B)** Inmuntinción con un anticuerpo específico para la proteína humana golgina-97. El canal de colocalización fue generado a partir de los pixeles con valores de PDM por arriba del promedio en ambos canales. R: coeficiente de colocalización de Manders. **(E)** *Western blot* anti GFP de extractos totales (Input) o de la fracción de proteínas biotiniladas (Biot) de células que expresaban establemente a GFP (control negativo) o a las proteínas hSIDT1 y mSIDT2 fusionadas a GFP. Nótese que GFP sólo se detecta en la fracción total pero no en las proteínas biotiniladas.

Tanto en hSIDT1 como en mSIDT2 se predice un péptido señal y una localización en membrana plasmática, por lo que se empleo el marcador de membrana FM4-64 en células vivas para corroborar su presencia en este organelo (Figura 22D). Llama la atención que también se observa una colocalización positiva entre algunas de las vesículas GFP+ y el FM4-64 endocitado: la internalización basal del FM4-64 es

un marcador de endocitosis basal. Para comprobar la presencia de las proteínas quiméricas en la membrana plasmática se hicieron ensayos de biotilación inespecífica de proteínas de membrana plasmática (Figura 22E) detectando su presencia e las fracciones de proteínas biotiladas, inclusive detectamos un ligero aumento de en el peso molecular de hSIDT1 y que mSIDT2 es un doblete, estos cambios podrían deberse a modificaciones postraduccionales de las proteínas en a la membrana plasmática. Este resultado corrobora que por lo menos una fracción de hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP se encuentra en la membrana celular.

Para caracterizar a mayor detalle la naturaleza de las vesículas de hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP se empleó al marcador de endosomas RhoB (EndoCyan) junto con el FM4-64 a mayores tiempos de incubación lo que permite identificar más claramente los endosomas (Figura 23A). De esta manera, detectamos que hay un pequeño porcentaje de vesículas GFP positivas que colocalizan con ambos marcadores (EndoCyan/FM) pero, la mayoría de las vesículas colocalizan sólo con EndoCyan indicando que son endosomas. Estos endosomas también colocalizan con las vesículas de colesterol fluorescente DHE (Figura 23B), aunque como en el caso de los endosomas Rho+, hay un porcentaje importante de vesículas DHE+ que no colocalizan con GFP. También es importante mencionar que la colocalización de GFP con DHE, no sólo se observó en las vesículas sino también en el RE.

Dado que SIDT1 y SIDT2 poseen dominios CRAC en sus secuencias (Anexo II), decidimos evaluar la interacción entre el colesterol fluorescente DHE y las proteínas hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP midiendo la transferencia de energía tipo FRET con un protocolo idéntico al previamente descrito para CUP-1::GFP. De esta manera detectamos una señal positiva de FRET (Figura 23C), sugiriendo una interacción directa entre el colesterol y las proteínas de mamífero.

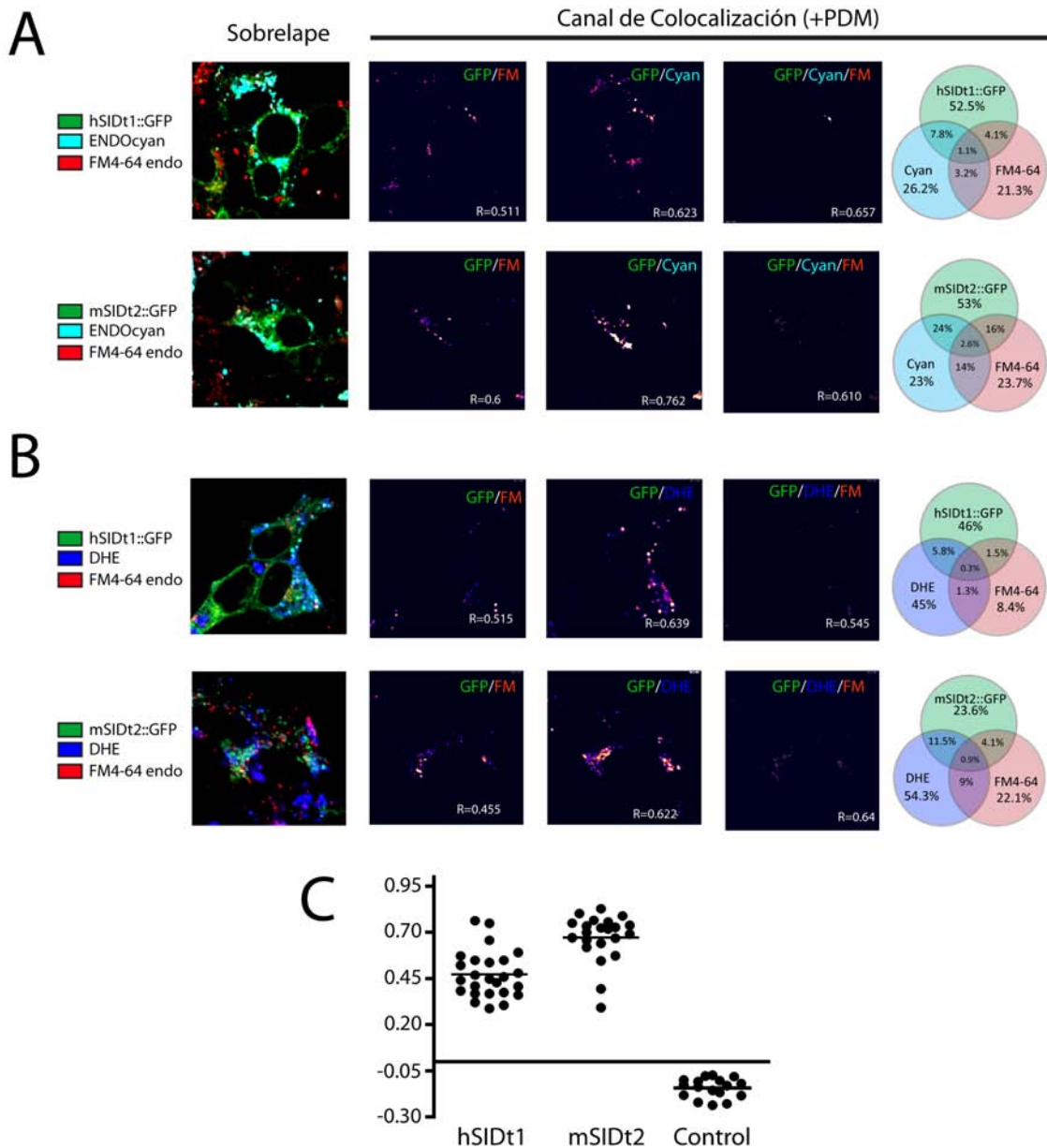


Figura 23. hSIDT1 y mSIDT2 se localizan en endosomas de colesterol. Células que expresaban establemente a las proteínas quiméricas hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP fueron transfectadas con **(A)** EndoCyan o **(B)** incubadas con el colesterol fluorescente DHE. Posteriormente las células fueron incubadas con FM4-64 por 2 horas y evaluadas por microscopia confocal. Para cada caso los canales de colocalización fueron generados a partir de los pixeles con valores PDM por arriba del promedio en cada canal. R: coeficiente de colocalización de Manders. Los porcentajes de colocalización fueron determinados a partir de la densitometría los canales de colocalización tomando a la suma de los tres canales (verde/rojo/azul) como el 100%. **(C)** Eficiencia de FRET determinada como el aumento en la fluorescencia del donador DHE después del fotoblanqueo del aceptor GFP. Control: zona de la misma célula donde no se efectuó el fotoblanqueo.

4.10 En *Mus musculus*, SIDT1 tiene una expresión tejido específica mientras que SIDT2 es ubicuo.

Para complementar los estudios de los homólogos de CUP-1 en ratón, evaluamos la expresión de mSIDT1 y mSIDT2 en distintos tejidos de animales adultos y durante el desarrollo embrionario. mSIDT1 tiene una expresión que apunta a ser tejido específica: la mayor expresión fue detectada en el timo y cerebro, seguido del intestino, pulmones, testículos y riñón (Figura 24A). Otros tejidos presentan una baja expresión como el corazón, el bazo o el hígado, mientras que su transcrito no fue detectado ni en cerebelo ni en páncreas. Durante la mayor parte del desarrollo, SIDT1 está ausente; su expresión se comienza a detectar en el día E13 y aumenta conforme avanza el desarrollo embrionario (Figura 24B). Por otro lado, la expresión de mSIDT2 fue detectada en todos los tejidos y etapas embrionarias analizadas (Figura 24A y B), llamando particularmente la atención el alto nivel de expresión durante el desarrollo embrionario (similar a los niveles de GAPDH). Sin embargo, en los tejidos adultos, aunque ubicua, su expresión es mucho menor: en promedio 10 veces menos que en los embriones, y siempre menor que mSIDT1.

Interesantemente, al examinar los patrones de expresión de hSIDT1 y hSIDT2 en las bases de datos de transcritos humanos, observamos que tienen patrones similares a los que nosotros detectamos en ratón (Anexo III): mientras que hSIDT2 es prácticamente ubicuo en todos los tejidos, hSIDT1 solo se detecta en algunos, siendo el cerebro, el pulmón, el intestino y el timo donde se detecta su mayor expresión.

Dada la alta expresión de mSIDT2 en los embriones, decidimos explorar sus zonas de expresión mediante hibridación *in situ* de embriones de ratón. Para esto clonamos un fragmento del 3'-UTR de mSIDT2 el cual fue empleado como sonda. La expresión de mSIDT2 parece estar concentrada en varias estructuras en los

embriones, por ejemplo la placa basal del cerebro medio, una estructura compuesta por motoneuronas precursora de la sustancia gris de la médula espinal, o el telencéfalo que propiamente forma el cerebro en el adulto. También el ojo, el hígado y la vesícula ótica (que da origen al oído), presentaron señal de expresión de mSIDT2.

Al evaluar la expresión de SIDT2 en distintas líneas celulares humanas y murinas encontramos que su mensajero siempre está presente aunque sus niveles varían (Figura 24D). Y por el contrario, no pudimos identificar una línea celular que expresara a SIDT1 de manera endógena. Valdrá la pena evaluar el significado biológico de estos resultados.

En conjunto, estas observaciones nos permitirían suponer que mSIDT2 tiene un papel primordial durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, en tejidos adultos, la expresión de mSIDT1 es predominante (aunque aun se detecta a mSIDT2). Por lo que podríamos suponer que estas proteínas juegan papeles distintos más no redundantes. Igualmente llama la atención que, mientras SIDT2 es ubicuo, SIDT1 no fue detectado en ninguna línea celular, lo que podría suponer, aunque aventurado, un papel como gen supresor de tumores de éste último. Por supuesto, más trabajo será requerido para esclarecer la función y relevancia de estos genes en mamíferos y en especial durante el desarrollo.

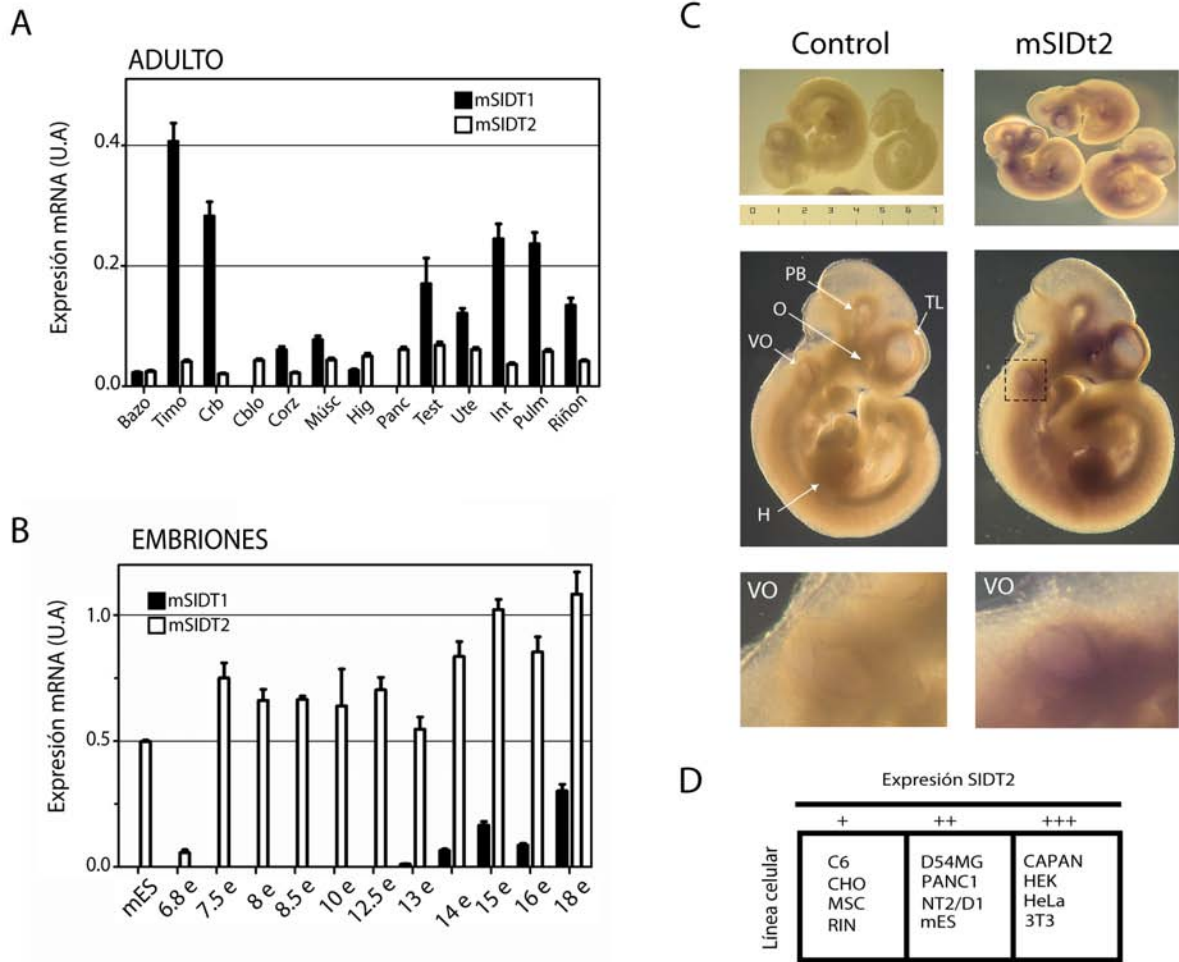


Figura 24. Expresión de SIRT1 y SIRT2. La abundancia relativa de cada transcrito fue evaluada por RT-PCR semicuantitativo: cada muestra fue analizada en un gel de agarosa y normalizado con GAPDH por densitometría de cada banda de DNA. **(A)** Tejidos adultos de ratón: bazo, timo, cerebro, cerebelo, corazón, músculo esquelético, hígado, páncreas, testículo, intestino, pulmón y riñón. Barras: promedio \pm desviación estándar. U.A: unidades arbitrarias. **(B)** Embriones (e) de 6.8 a 18 días post-coitum. Barras: promedio \pm desviación estándar. U.A: unidades arbitrarias. **(C)** Hibridación *in situ* de embriones completos de ratón de 11.5 días. Control: sonda de RNA sentido del 3'-UTR de mSIRT2; mSIRT2: misma secuencia antisentido. Ambas sondas marcadas con digoxigenina y reveladas por fosfatasa alcalina (color púrpura). PB: Placa basal del cerebro medio; TL: telencéfalo; O: ojo; VO: vesícula óptica; H: hígado. El recuadro punteado indica la zona de la vesícula óptica ampliada en los paneles inferiores. **(D)** Abundancia relativa de SIRT2 evaluado por RT-PCR de distintas líneas celulares normalizado con GAPDH. C6: glioma de rata; CHO: ovario de hámster chino; MSC: neuroblastoma humano; RIN: insulinoma de rata; D54MG: astrocitoma humano; PANC1: adenocarcinoma de ducto pancreático; NT2/D1: teratocarcinoma humano; mES: células madre embrionarias de ratón; CAPAN: adenocarcinoma pancreático humano; HEK: riñón embrionario humano; HeLa: epiteliales humanas; 3T3: fibroblastos de ratón. +: expresión baja (comparable a tejidos adultos); ++: expresión media (comparable a mES); +++: expresión alta (comparable a embriones 18 días)

5. Discusión

Al ser una molécula hidrofóbica, y por tal poco soluble en agua, el colesterol no puede viajar libremente por el torrente sanguíneo o por el citosol, por lo que se han desarrollado complejos mecanismos para translocarlo de un lado al otro de la membrana. En el presente trabajo presentamos evidencia que sugiere que hemos encontrado una nueva familia de proteínas involucradas con el metabolismo de colesterol tanto en *C. elegans* como en mamífero. A continuación se profundiza en las evidencias presentadas.

5.1 CUP-1: una nueva proteína esencial en el metabolismo de colesterol en el nematodo *C. elegans*.

La ausencia de la proteína CUP-1, ya sea en la mutante *cup-1(gk245)* o al silenciar a su mensajero vía RNAi, resulta en animales especialmente sensibles a la carencia de colesterol en el medio en el que crecen. Estos animales presentan una reducción en su tamaño (aproximadamente 60% más chicos que los animales control) y un incremento en la letalidad embrionaria, además de problemas en el desarrollo que se refleja en un retardo en su desarrollo y en un menor porcentaje de larvas que llegan a la etapa adulta.

Las vías por las cuales el colesterol está involucrado en el control del tamaño de *C. elegans* no están plenamente identificadas. Algunos autores han sugerido que es la disminución de hormonas esteroideas (resultado de la falta de colesterol en la dieta), la responsable de estos fenotipos^{80,85,86}; aunque no se han identificado sus ligandos, en el genoma de *C. elegans* se predicen más de 260 receptores a hormonas esteroideas⁷⁵. Se ha sugerido que estas hormonas están involucradas en la ovogénesis, y que por lo tanto su disminución podría ser responsable de la baja fertilidad asociada a las alteraciones en la distribución y menor número de ovocitos observados en los animales carentes de CUP-1 que crecen sin colesterol.

En general, los lípidos son importantes para contender con distintos tipos de estrés, al amortiguar los daños ocasionados por radicales libres producidos por luz UV, compuestos oxidantes o altas temperaturas. Se ha demostrado que un nemátodo transgénico capaz de sintetizar colesterol de manera endógena incrementa su capacidad para lidiar con estrés calórico⁹⁹. En este sentido, nosotros observamos que los animales carentes de CUP-1 son por el contrario, más sensibles a altas temperaturas. Este resultado es compatible con la hipótesis que los animales carentes de CUP-1 tienen menos colesterol y por lo tanto, su capacidad para lidiar con el estrés calórico se ve disminuida. Es importante mencionar que la tinción de lípidos de la cepa *cup-1(gk245)* con los colorantes Oil Red-O o Sudan Black, no reveló diferencias en la cantidad o distribución de sus lípidos (Anexo IV), lo que nos hace suponer que la menor de los animales carentes de CUP-1 sólo se debe a los bajos niveles de colesterol.

La ausencia de CUP-1 también resultó en una clara disminución en la movilidad/velocidad de los gusanos. No está del todo claro la razón por la cual la carencia de colesterol resulta en problemas en la movilidad de *C. elegans*. Quizás sean defectos sutiles en el desarrollo (resultado de la falta de hormonas) los responsables de este fenotipo. También se ha observado que la falta de esteroides tiene repercusiones en la formación de la cutícula de los nemátodos, específicamente en la muda de una etapa larvaria a otra⁸³; tal vez sea la incapacidad para desprenderse de la vieja cutícula la que está afectando la movilidad de los gusanos. Es importante mencionar que la disminución en la velocidad de los animales carentes de CUP-1 se observó incluso en condiciones normales de colesterol, mientras que los otros fenotipos (fertilidad, desarrollo, termorresistencia) parecen ser sólo evidentes en medios reducidos en colesterol. Será interesante elucidar los mecanismos específicos por los cuales la falta de CUP-1 repercute en la velocidad en condiciones normales.

5.2 CUP-1 esta directamente involucrado con la toma de colesterol dietético en *C. elegans*

Al evaluar la capacidad para incorporar colesterol ambiental de los animales carentes de CUP-1 observamos una disminución en la marca radioactiva del ^3H -colesterol, o de la marca fluorescente del análogo NBD. Estas observaciones sugieren fuertemente que CUP-1 participa directamente en la incorporación (o retención) de colesterol proveniente de la dieta de los gusanos.

Llama la atención la disparidad entre la incorporación de colesterol radioactivo y fluorescente en la cepa *cup-1(gk245)*: mientras que la disminución en la incorporación de NBD es cercana al 80%, en los gusanos creciendo con colesterol radioactivo aun se detecta aproximadamente la mitad de la entrada. Por lo menos dos hipótesis (no necesariamente excluyentes) podrían explicar estas observaciones: 1) la detección del colesterol radioactivo es muchísimo más sensible y permite detectar menores cantidades de colesterol; 2) la ventana de detección del NBD es menor puesto que depende de la capacidad para detectar la fluorescencia del compuesto y del ruido basal. Por otro lado, el colesterol radioactivo esta marcado en los hidrógenos de los carbonos 1 y 2 del primer anillo, mientras que en el NBD, el fluoróforo se encuentra en la cadena alifática del carbono 17 (ver Figura 13B), y es justamente esta posición la que sufre la mayoría de las modificaciones, para producir p. ej, hormonas esteroideas (ver Figura 2). Esto nos hace suponer que el NBD, al seguir las vías normales de metabolismo de colesterol, perdería dicho fluoróforo, mientras que el colesterol radioactivo conservaría los átomos de tritio. De esta manera, la mayor marca radioactiva observada es el resultado, no sólo de la internalización inicial de colesterol, sino también de la acumulación de metabolitos secundarios. En este sentido, el NBD podría ser un mejor indicador sólo de la entrada inicial de colesterol. Por supuesto, experimentos específicos serían necesarios para demostrar estas suposiciones.

Al explorar la redundancia entre CUP-1 y dos genes involucrados en la movilización intracelular de colesterol (*ncr-1* y *ncr-2*), observamos que no hay un efecto aditivo entre estos genes y CUP-1 en lo que respecta a la disminución en la internalización de colesterol radioactivo. Este resultado sugiere que estas proteínas no tienen funciones redundantes y que por el contrario, están participando en vías distintas, siendo sólo CUP-1 el involucrado en la toma de colesterol del medio ambiente. Este resultado concuerda con estudios recientes donde, empleando el fotoblanqueo específico del DHE, se demostró que NCR-1 y NCR-2 sólo participan en el transporte intracelular de colesterol⁹⁰.

A pesar de la clara participación de CUP-1 en la internalización de colesterol, es evidente que deben existir otras vías paralelas, dado el hecho que la ausencia de CUP-1 no resulta en letalidad de los animales y a que se ha demostrado que una completa privación de colesterol es letal. Una posible explicación podría ser que la endocitosis basal en el intestino introduzca suficiente colesterol para satisfacer las necesidades de este esterol; esto explicaría porque los animales carentes de CUP-1 tienen tamaño y fertilidad normales al crecer en un medio suplementado con colesterol: es sólo cuando los animales carentes de CUP-1 crecen en un medio reducido en colesterol cuando los niveles de colesterol internalizado bajan lo suficiente como para hacer evidentes los fenotipos.

5.3 La expresión de CUP-1 correlaciona con zonas ricas en colesterol principalmente en el tracto digestivo de *C. elegans*

Al evaluar la expresión de CUP-1 mediante el reportero de GFP, observamos que se expresa principalmente en las células que forman el tracto digestivo del nemátodo y que a su vez, éstas colocalizan con el colesterol fluorescente DHE. Este dato es relevante pues el intestino no solo es la primer zona de contacto con los esteroides ingeridos, sino también la principal zona de acumulación y modificación de estos⁷⁰. En particular, observamos una señal elevada en la *válvula*

faringeo-intestinal y el bulbo terminal de la faringe, esto es interesante pues en esta zona se localiza el “*nerve ring*”¹⁰⁹, una estructura compuesta por terminaciones axonales de neuronas sensitivas involucradas en responder a estímulos táctiles, químicos y temperatura, además de estar implicadas en la inducción del estado larvario dauer y control del movimiento. Se ha sugerido que el colesterol es importante en el funcionamiento de estas neuronas^{78,110} y por lo tanto podría tener una relación con la falta de movilidad y las alteraciones en la termoresistencia observadas en los animales carentes de CUP-1.

La expresión de CUP-1 también fue detectada en una estructura que posiblemente corresponda a las células de la glándula excretora de la faringe, lo que es relevante pues estas células son el sitio inicial de almacenamiento de esteroides absorbidos de la dieta⁷⁹. Por su parte, la expresión de CUP-1 en la parte posterior del intestino de *C. elegans* podría sugerir zonas de acumulación de esteroides metabolizados y modificados, específicamente en las células “*phasmid socket*”⁷⁹. También detectamos la presencia del reportero de expresión en los embriones, donde CUP-1 podría jugar un papel redundante con el sistema de endocitosis de complejos vitelogenina/colesterol mediado por el receptor RME-2⁷⁸ de los ovocitos, lo que nos habla de la importancia del colesterol en el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, este último dato habrá que tomarlo con reservas pues se ha mencionado que la GFP puede ser internalizada de manera inespecífica por ovocitos y embriones¹⁰⁰.

Se ha establecido que el colesterol es internalizado desde etapas tempranas del desarrollo larvario⁷⁸, en este sentido, nosotros detectamos la presencia de CUP-1 desde la primera etapa larvaria haciendo a este gen un buen candidato para explicar la entrada temprana de colesterol a las larvas. Por supuesto se requieren más experimentos para corroborar la funcionalidad de CUP-1 en todas las etapas larvarias.

5.4 La localización subcelular de CUP-1, SIDT1 y SIDT2 es compatible con proteínas involucradas en la endocitosis de colesterol

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de CUP-1 y de sus homólogos en mamíferos SIDT1 y SIDT2, predice un péptido señal en los primeros 17-20 aminoácidos del amino-terminal y una localización en membrana plasmática. Además se predicen 9 segmentos transmembranales para CUP-1 y 10 para los homólogos. Al expresar en células de mamíferos las proteínas fusionadas con la proteína verde fluorescente (CUP-1::GFP, hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP), observamos que al menos un porcentaje de estas proteínas quiméricas se localizan en la membrana plasmática. Adicionalmente, este dato fue corroborado mediante la biotilación inespecífica de proteínas de membrana. La presencia de estas proteínas en la membrana plasmática es compatible con su función como receptores de colesterol involucrados en endocitosis, sobretodo si tomamos en cuenta la presencia de motivos CRAC extracelulares.

Además de la expresión de las proteínas quiméricas en la MP, la mayor parte de la señal es intracelular, específicamente en el RE y Golgi. Dada la naturaleza hidrofóbica de estas proteínas, suponemos que se encuentran insertadas en la membrana de estos organelos que interesantemente, son el lugar donde el colesterol sufre muchas de las modificaciones para generar subproductos con actividad biológica.

También se observa una importante proporción de la señal de las proteínas quiméricas en estructuras similares a vesículas que colocalizan con la proteína RhoB, una GTPasa que se localiza en la superficie de vesículas de vías endocíticas¹¹¹, lo que demuestra que estas vesículas GFP+ son endosomas. En menor proporción, hay una población de vesículas GFP+ que colocaliza con el marcador FM4-64 endocitado por la endocitosis basal inespecífica. La presencia de las proteínas quiméricas en endosomas correlaciona con la identificación de varias señales de endocitosis YXXØ* (en las asas intracelulares)

* “*tyrosine-based sorting signals*” Ø = L, V, I, F, M; X= cualquiera aminoácido.

** “*dileucine-based signals fit*”

y E/DXXXLL/LI** (cerca de segmentos transmembranales) tanto en CUP-1 como en sus homólogos (Anexo II). Estas secuencias son sitios de reconocimiento de proteínas del complejo AP^Δ que a su vez interacciona con el complejo de clatrina para inducir su internalización y por lo tanto se asocian a la rápida endocitosis de proteínas de membrana⁹⁶. Estas señales también se relacionan con el direccionamiento de endosomas a lisosomas; en este sentido, nosotros observamos una colocalización positiva entre las proteínas quiméricas y un marcador de lisosomas, lo que podría corresponder a la fusión de éstos con los endosomas internalizados. Interesantemente, NPC1, la proteína que media la salida del colesterol endocitado, también se localiza en endosomas tardíos y lisosomas¹¹². Adicionalmente, observamos que un porcentaje de las proteínas quiméricas se localizan en el aparato de Golgi; al menos CUP-1 y SIDT2 tienen secuencias DXXL** (Anexo II) que se sabe interaccionan con el complejo de proteínas GGA[¥] que a su vez, media el tráfico de vesículas del trans-Golgi (TGN[☉]) a lisosomas y vías de exocitosis/secreción⁹⁶.

Cuando las células que expresaban a las proteínas quiméricas fueron incubadas con el colesterol fluorescente DHE, observamos que una proporción importante de los endosomas positivos para GFP también colocalizan con DHE. Este resultado nos hace suponer que estas proteínas no sólo participan en la endocitosis de colesterol en la membrana plasmática, sino también en el tránsito de los endosomas al RE, Golgi y lisosomas. Cabe mencionar que también hay una población de vesículas de colesterol que no colocalizan con GFP+, esto quizás sea el reflejo de las vías canónicas de internalización de colesterol operando en las células (e.g. los receptores LDL)

Δ “Adaptor Protein”

¥: Golgi localized γ -ear-containing ARF-binding proteins

☉: Trans Golgi-network

5.5 CUP-1, SIDT1 y SIDT2 interactúan directamente con el colesterol

Tanto CUP-1 como sus homólogos tienen motivos CRAC conservados en su secuencia (Figura 20B ; Anexo II), estos motivos se han identificado como sitios de unión a colesterol en proteínas involucradas en el transporte, metabolismo y regulación de este esteroide^{58,113}. Para evaluar la interacción entre el análogo fluorescente de colesterol DHE y las proteínas quiméricas CUP-1::GFP, hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP, cuantificamos la transferencia de energía tipo FRET entre la molécula de DHE y la GFP: en todos los casos detectamos una eficiencia de FRET positiva. La distancia mínima para que ocurra una transferencia de energía tipo FRET son 10 nm y además tiene que existir cierta orientación entre los dipolos de los fluoróforos, por lo que la transferencia de energía tipo FRET no sólo es indicativa de cercanía, sino también de una interacción directa entre el colesterol y las proteínas quiméricas de *C. elegans* y mamíferos.

Para corroborar la especificidad de la interacción entre CUP-1 y el colesterol fluorescente DHE, se substituyó por glicina a la tirosina central de los motivos CRAC extracelular y transmembranal que están conservados tanto en *C. elegans* como en mamíferos (Anexo II). Esta tirosina interactúa directamente con el grupo 3'-OH del colesterol⁹⁷, por lo que su substitución imposibilita la unión del motivo CRAC con el esteroide. La mutagénesis del dominio CRAC transmembranal de CUP-1 resultó en un decremento significativo en la eficiencia de FRET entre la proteína y el DHE. Este resultado demuestra que existe una interacción directa entre este motivo CRAC y el colesterol. Los dominios CRAC transmembranales han sido identificados como sitios de unión a colesterol en proteínas capaces de mediar la translocación de colesterol de un lado al otro de la membrana, como en el Receptor periférico de benzodiazepinas humano (PBR), que entre varias funciones, está involucrado en la biosíntesis de esteroides en la mitocondria⁵⁸.

Aunque la mutagénesis del dominio CRAC transmembranal resulta en un decremento significativo en la eficiencia de FRET, aun observamos cierto FRET residual. Esto se puede deber a que aún existen interacciones entre CUP-1-mutagenizado y el DHE, por ejemplo, a través de otros dominios de unión a colesterol no identificados. Adicionalmente, sería interesante evaluar si la delección completa del motivo CRAC tiene una mayor repercusión en la eficiencia de FRET que el cambio de un solo aminoácido.

La mutagénesis del dominio CRAC extracelular de CUP-1 no tuvo un efecto estadísticamente significativo en el FRET. Este resultado era esperado pues, en este caso, la distancia entre los fluoróforos es mayor a 10 nm al estar en lados opuesto de la membrana. En este mismo sentido, la mutagénesis de ambos motivos CRAC de CUP-1 es equivalente a la mutante simple transmembranal, sugiriendo que sólo el motivo CRAC transmembranal participa en el FRET en la doble mutante. Es importante recalcar que estos resultados no descartan la funcionalidad del motivo CRAC extracelular; dominios extracelulares de unión a esteroides han sido sugeridos como el sitio inicial de reconocimiento y/o anclaje de colesterol en proteínas involucradas con la internalización de colesterol^{58,114,115}, de hecho, nosotros identificamos cuatro dominios CRAC (dos extracelulares, dos transmembranales) en NCR1L1, la proteína encargada de internalizar colesterol libre en el intestino humano (Anexo V). Otro tipo de estrategias harán falta para corroborar la funcionalidad del motivo CRAC extracelular de CUP-1.

Llama la atención que, aunque no fue estadísticamente significativa, se observe una reducción en la eficiencia de FRET en la mutante del CRAC extracelular respecto a la proteína silvestre (22%±4 vs 26%±5, respectivamente). Aunque aventurado, podríamos suponer que esta tendencia se debe a que la mutación del CRAC extracelular resulta en una disminución en la eficiencia y/o capacidad de CUP-1 para unir colesterol lo que repercute (indirectamente) en el FRET medido en el motivo CRAC transmembranal. Por supuesto, una aproximación más detallada será necesaria para esclarecer esta suposición.

5.6 El papel de SIDT1 y SIDT2 en mamíferos

Tanto en humano como en ratón, SIDT1 y SIDT2 tienen una expresión diferencial; mientras que el primero está enriquecido en algunos tejidos como cerebro, intestino, pulmón y timo, SIDT2 es prácticamente ubicuo siendo detectado en prácticamente todos los tejidos y líneas celulares. Dado que ambas proteínas se expresan en la membrana plasmática y tienen dominios de unión a colesterol extracelulares podríamos suponer que ambas participan en la endocitosis de colesterol. Sin embargo queda abierta la pregunta respecto a si SIDT1 y SIDT2 tendrán papeles redundantes o complementarios en los tejidos que expresan ambos genes. Incluso podríamos suponer con base en la naturaleza de las señales endocíticas, que funcionan de manera secuencial: SIDT1 mediando la entrada inicial y SIDT2 mediando el transporte de los endosomas a distintos organelos o direccionando la secreción de metabolitos de colesterol.

A pesar de que los mamíferos son capaces de sintetizar colesterol *de novo*, cerca de la mitad del colesterol proviene de la dieta⁵¹. En el intestino, NPC1L1 es la proteína principalmente responsable de la absorción de colesterol, pero recientemente se ha detectado una entrada independiente de NPC1L1 puesto que ratones *knockdown* para este gen aun son capaces de internalizar cantidades significativas de colesterol¹¹⁶. Resulta atractivo pensar que SIDT1 pudiera ser el responsable de esa entrada de colesterol aun sin identificar en mamíferos.

Algunos tejidos requieren una mayor cantidad de colesterol, particularmente el cerebro que, aunque representa sólo 2.1% del peso del cuerpo, contiene el 23% del total del colesterol¹¹⁷. El colesterol en el cerebro está implicado en muchas funciones que van desde el tráfico vesicular y la homeostasis del calcio, hasta regular la actividad de varios receptores, enzimas y canales¹¹⁸, incluso la sensibilidad al neurotransmisor GABA esta regulada por colesterol¹¹⁹. Adicionalmente

el colesterol es uno de los componentes principales de la mielina que recubre los axones y terminaciones nerviosas¹²⁰. Dada su naturaleza hidrofóbica, el colesterol presente en el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas no puede atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser sintetizado *in situ* por las células nerviosas. En el SNC se ha desarrollado un transporte “horizontal” célula-a-célula para garantizar el suministro de colesterol en el cerebro¹²¹, siendo la apolipoproteína E (ApoE) la responsable de este tránsito célula a célula¹²². Sin embargo, en cultivo, ApoE no tiene ningún efecto sobre la formación de sinapsis, mientras que la adición de colesterol libre aumenta hasta doce veces la sinaptogénesis¹²³. Otros lípidos que también se unen a ApoE como la fosfatidilcolina o la esfingomielina, no tienen un efecto significativo y por el contrario, son tóxicos a altas dosis. Resulta atractivo pensar que SIDT1 y SIDT2 pudieran ser responsables de la absorción de colesterol libre en el cerebro y que por lo tanto tengan un efecto directo en la sinaptogénesis. Dado que la formación de sinapsis esta directamente relacionada a la memoria, el aprendizaje y todas las funciones mentales tanto en condiciones normales como patológicas, el que estas proteínas estuvieran involucradas abriría un nuevo e interesante campo de estudio.

Por otro lado, llama particularmente la atención que durante el desarrollo embrionario (ya sea en ratones o humanos) se detecte una abundante expresión de SIDT2 mientras que SIDT1 está ausente. Dado que el colesterol es fundamental desde la fertilización y durante todo el desarrollo embrionario y de hecho, la irrupción del metabolismo de colesterol durante el desarrollo tiene importantes repercusiones en la organogénesis (en particular del SNC)¹²⁴, nos hace suponer que SIDT2 tendrá un importante papel durante el desarrollo embrionario.

Por ultimo, una posibilidad es que SIDT1 y SIDT2 no solo participen en la internalización de colesterol, sino también de hormonas esteroideas. En general se tienen bien caracterizados a los receptores de hormonas intracelulares, pero poco

sabe de los mecanismos para su internalización del medio extracelular. Se ha sugerido que las hormonas esteroideas atraviesan libremente la membrana celular, pero en realidad esto es poco probable si tomamos en cuenta las propiedades químicas de las membranas y las mismas hormonas; deben existir mecanismos específicos para su internalización. Estructuralmente estas hormonas poseen los cuatro anillos que son reconocidos por los motivos CRAC, por lo que no sería imposible pensar que SIDT1 y/o SIDT2 pudieran reconocerlas e internalizarlas a sus células blanco. Lo mismo sería válido para los neuroesteroides o los oxiesteroles que están presentes en el torrente sanguíneo y que se han relacionado con diversos procesos biológicos^{13,125,126}. Por supuesto, experimentos específicos serán necesarios para esclarecer la participación de SIDT1 y SIDT2 en estas vías.

6. CONCLUSIONES

6.1 Modelo de Funcionamiento

Basados en, 1) la localización subcelular de las distintas proteínas quiméricas, 2) la interacción directa de CUP-1, hSIDT1 y mSIDT2 con el colesterol fluorescente, y 3) la expresión intestinal de estos genes tanto en nemátodo como en mamíferos, proponemos un modelo en donde CUP-1 (o sus homólogos) participan directamente en la internalización de colesterol libre obtenido de la dieta (Figura 24).

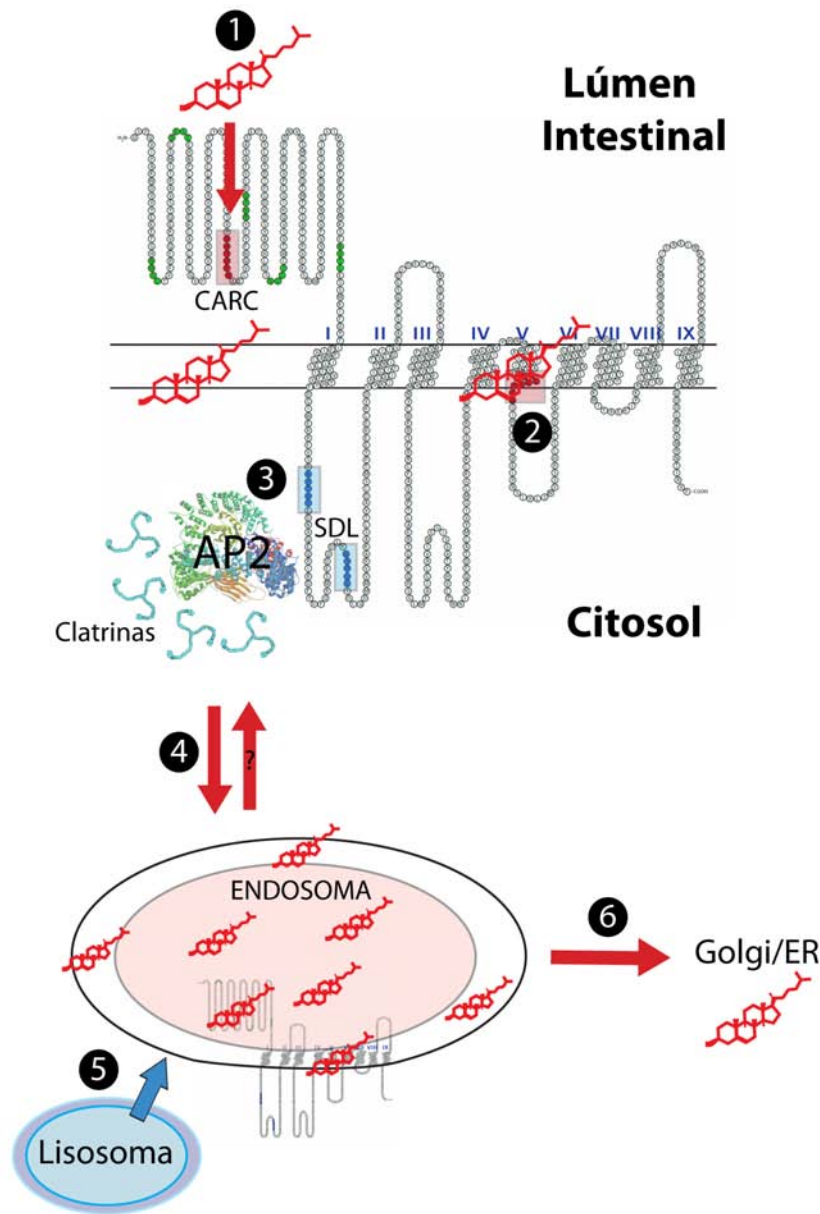


Figura 24. Modelo del funcionamiento intestinal de CUP-1. En las membranas de los enterocitos se predice que el amino terminal sea extracelular, quedando expuesto a los esteroides obtenidos de la dieta. (1) El colesterol interactúa con el motivo CRAC extracelular. (2) El colesterol pasa a la membrana o al segundo dominio CRAC transmembranal. (3) Se induce un cambio conformacional de tal manera que las señales endocíticas (YXXO, DXXL) son reconocidas por el complejo AP que a su vez es reconocido por clatrin para inducir su internalización. (4) El endosoma temprano contiene tanto a CUP-1 como moléculas de colesterol. Este endosoma puede ser reciclado a la membrana plasmática o, (5) fusionarse con lisosomas. (6) En un paso posterior, el endosoma puede ser redireccionado a la zona del trans-Golgi para secreción o el colesterol puede escapar del endosoma (vía NCP1) al RE para ser metabolizado.

En las células del intestino (por ejemplo, los enterocitos), el dominio CRAC extracelular reconoce el colesterol libre proveniente de la dieta. Se ha propuesto para otras proteínas con sitios de unión a esteroides, un modelo donde el colesterol pasa del dominio inicial de reconocimiento extracelular a un segundo dominio interno¹¹⁴, que en el caso de CUP-1, podrían ser el CRAC extracelular y el del quinto segmento transmembranal. También se propone que, en un paso subsecuente, el pegado del colesterol a este segundo sitio pudiera provocar un cambio conformacional en CUP-1 que a su vez induzca su endocitosis vía los complejos AP/Clatrina. En un paso posterior, el colesterol deberá escapar de los endosomas/lisosomas hacia el RE para ser modificado y metabolizado o direccionarse a Golgi para seguir una vía de exocitosis. En este sentido, es interesante que Golgi también es un sitio de modificación de lípidos y es en el TGN donde se dirigen las vesículas a vías de secreción y lisosomas¹²⁷.

Por supuesto no podemos descartar que estas proteínas tengan un papel paralelo en las vías intracelulares de colesterol, por ejemplo en su acumulación y/o tránsito a otros organelos.

6.2 CUP-1: una nueva familia de proteínas involucradas en el metabolismo de colesterol, ¿un nuevo blanco terapéutico?

Así pues, la evidencia colectada en este trabajo nos lleva a proponer que CUP-1 de *C. elegans* es el primer miembro de una nueva familia de proteínas, con homólogos en mamíferos, involucradas en la internalización de colesterol.

Es importante recalcar que, al menos en las bases de datos disponibles a la fecha, no existen otros genes o proteínas que compartan homología con CUP-1 o sus homólogos. Tampoco se detectan dominios o motivos canónicos (fuera del motivo CRAC) que pudieran sugerir homología funcional con otras proteínas. Ni

quiera con NPC1L1, con quien podríamos decir que tienen homología funcional, hay una homología a nivel de secuencia. Esto nos hace suponer que nos encontramos ante una nueva familia de proteínas relacionadas con el metabolismo de colesterol, muy probablemente involucradas con la internalización y distribución de este.

Dado que las proteínas de mamíferos SIDT1 y SIDT2 tienen mayor homología con CUP-1 que con SID-1 y a que ni hSIDT1 ni mSIDT2 demostraron estar involucradas con la translocación de dsRNA, proponemos que en realidad son proteínas homólogas a CUP-1. Esperamos que trabajos posteriores demuestren que las proteínas humanas están involucradas en la internalización de colesterol lo que nos llevaría a proponer un cambio de nomenclatura que refleje tanto su función como su homología con CUP-1.

Por otro lado, si se demuestra que SIDT1 y SIDT2 están involucradas en la internalización de colesterol libre y no de lipoproteínas como las vías canónicas mediadas por receptores LDL y HDL, se agregará una pieza fundamental al estudio del metabolismo de colesterol en mamíferos.

Finalmente, los altos niveles de colesterol en sangre se asocian con una alta incidencia de aterosclerosis y muertes relacionadas con problemas cardíacos y circulatorios: se calcula que casi 4 millones de personas mueren al año debido a los altos niveles de colesterol en sangre¹²⁸. Actualmente el tratamiento para estos pacientes se basa en disminuir la ingesta de colesterol y suministrar inhibidores de la síntesis endógena (estatinas)¹²⁹. El uso de estos fármacos tiene la desventaja de disminuir la síntesis de colesterol en el cerebro que es incapaz de utilizar el colesterol dietético, por lo que se cree que el uso de estas drogas pudiera tener complicaciones a largo plazo en el SNC^{130,131}. Recientemente se ha desarrollado el fármaco Ezetimibe¹³² que inhibe la endocitosis del colesterol mediada por NPC1L1.

Dado que hasta el 80% del colesterol del cuerpo humano proviene de la dieta, este fármaco supone una excelente opción en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Por su parte, ni SIDT1 ni SIDT2 poseen el sitio de unión de Ezentamibe, lo que nos hace suponer que participan en una vía distinta a la mediada por NPC1L1. Sí en humanos, SIDT1 o SIDT2 resultan estar involucrados en la absorción intestinal de colesterol, se abrirá un nuevo campo para diseñar fármacos encaminados a disminuir los niveles de colesterol lo que sin duda tendrá importantes repercusiones en el ámbito de la salud.

7. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo hemos dado los primeros pasos en la exploración de una nueva vía de transporte de colesterol. Sin duda en *C. elegans* aun quedan varias interrogantes como la funcionalidad del dominio CRAC extracelular de CUP-1 o corroborar la expresión espacio-temporal de la proteína mediante el uso de anticuerpos específicos. Sin embargo, creemos que un paso interesante sería el profundizar el estudio de las proteínas de mamíferos SIDT1 y SIDT2. A continuación presentamos algunos puntos que nos parecen interesantes de explorar al respecto:

7.1 Comprobar experimentalmente que SIDT1 y SIDT2 median el transporte de colesterol

Para dicho fin proponemos sobreexpresar ambos genes en líneas celulares de mamíferos y evaluar su capacidad para internalizar colesterol radioactivo (ver

nota[§]). Conjuntamente proponemos silenciar, mediante RNAi, la expresión de SIDT2 endógeno esperando observar un decremento en la internalización basal de colesterol. Dado que las células de mamífero tienen una robusta entrada basal de colesterol mediada por distintas vías, quizás sea necesario evaluar la internalización de colesterol en un sistema bacteriano como se ha hecho para comprobar que otras proteínas son capaces de mediar dicho proceso⁵³.

Sea cual sea el sistema a utilizar, será interesante evaluar la funcionalidad de los motivos CRAC generados por mutaciones en éstos. De la misma manera, un cultivo celular permite evaluar la cinética de internalización (velocidad, saturación, Km), así como la afinidad por el sustrato.

7.2 Disecar la vía de entrada de colesterol mediada por SIDT1 y/o SIDT2

En este trabajo detectamos secuencias de endocitosis basadas en lisinas tanto en SIDT1 como en SIDT2 las cuales se asocian con endocitosis mediada por Clatrina, sin embargo, resulta fundamental comprobar experimentalmente si la internalización mediada por estas proteínas es realmente endocitosis y en su caso, si efectivamente es mediada por clatrina. Para dicho fin, proponemos usar fármacos que bloquean de manera específica este tipo de endocitosis (e.g clorpromazina) además de silenciar a los genes de clatrininas por RNAi.

7.3 Explorar la selectividad de SIDT1 y SIDT2

[§] Recientemente, en el laboratorio del Dr. L Vaca se cuenta con resultados preliminares, que pudieran sugerir que la transfección transitoria de mSIDT2 en células de mamíferos incrementa la internalización de colesterol radioactivo.

Dado que las hormonas esteroideas y otros derivados del colesterol, como los oxisteroles o neuroesteroles, poseen estructuras similares, sería interesante evaluar la capacidad de SIDT1 y SIDT2 para internalizar este tipo de moléculas. En este sentido, están disponibles comercialmente una gran variedad de hormonas esteroideas marcadas radioactivamente, e incluso se podrían realizar ensayos de competencia con colesterol no radioactivo para evaluar la especificidad del transporte.

También será fundamental evaluar si estas proteínas median exclusivamente la entrada de colesterol libre (similar a NCP1L1), o si también, pueden internalizar complejos de lipoproteínas de manera similar a lo que hace el receptor de LDL en humanos; metodológicamente es posible generar *in vitro* los complejos colesterol-lipoproteína. Creemos que este punto es fundamental, pues en caso de sólo mediar la entrada de colesterol libre, abrirá un campo completamente nuevo en el estudio del transporte tisular de colesterol en mamíferos.

7.4 Importancia del SIDT1 y SIDT2 en ratón.

Dado que SIDT1 y SIDT2 tienen patrones de expresión distintos, será interesante evaluar su papel en el animal completo. Actualmente están disponibles células madre embrionarias de ratón con deleciones en los locus de SIDT1[✓] o SIDT2^{✓✓}. Con estas células sería plausible generar un ratón *knockdown* condicional (y/o tejido específico) para estos genes. En estos animales se podría evaluar desde la internalización de colesterol dietético hasta problemas en el desarrollo temprano y del SNC dada su expresión y el papel que juega el colesterol en estos procesos.

✓ <http://www.komp.org/geneinfo.php?geneid=78915/>
✓✓ <http://www.komp.org/geneinfo.php?geneid=78916/>

En resumen, este tipo de estudios podrían contribuir con una pieza fundamental en el metabolismo de colesterol en mamíferos y por lo tanto para el entendimiento de su relación con enfermedades complejas que van desde desordenes del metabolismo de lípidos como la enfermedad de Niemann-Pick, hasta Huntington¹³³, demencia/depresión¹³⁴ o inclusive Alzheimer¹³⁵, donde los niveles de colesterol parecen jugar un papel central.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El NBD, DAPI, los marcadores de organelos FM4-64, LysoTracker, ER-tracker, enzimas, anticuerpos primarios y secundarios fueron comprados de Invitrogen. El DHE, colesterol, etanol grado biología molecular, glicina, IPTG, antibióticos y sales fueron comprados de Sigma-Aldrich. El colesterol tritiado [1,2-³H]-cholesterol (50 Ci/mmol) fue comprado a PerkinElmer. Bactotryptone (pancreatic digest) y el Agar fueron de BD. NaCl y Fosfato de potasio de J.T.Baker. El paraformaldehído granular y los cubreobjetos de Electron Microscopy Sciences. El medio de fluorescencia Dako se compró a DakoCytomation. Los modelos de topología fueron generados en el servidor TMHMM Server v.2.0

C. elegans

La variedad Bristol N2 fue usada como cepa silvestre en todos los experimentos. Las cepas *cup-1(gk245)* (VC452) y *ncr1(nr2022);ncr-2(nr2023)* (JT10800) fueron obtenidas del “C. elegans Genetic Center” de la Universidad de Minnesota. Las dobles mutantes fueron obtenidas de cruzar la machos *cup-1(gk245)* con hermafroditas *ncr1(nr2022);ncr-2(nr2023)*. La presencia de los alelos mutantes fue corroborada mediante RT-PCR utilizando los siguientes primers:

cagcaaagatctgcaccgta y cgtaaaagcttgacatgcga para *gk(245)*; tctcttctgtcgagccctgg y cagagtaccaaccagctgagggc para *nr2022*; y gtgtggtgagtggtgtagactaggac y cagcagatgaatttcttctctgg para *nr2023*. La progenie fue evaluada por siete generaciones para asegurar la homocigosis de las mutaciones. La cepa GFP reportera BC12913 (transgen *sls10486*) fue obsequiada por el “BC *C. elegans* Gene Expression Consortium” de Vancouver Canadá.

Todas las cepas de *C. elegans* fueron propagadas a 20 °C en “*nematode growth medium*”[⌘] (NGM) al 2% de Agar y suplementado con 8 µg/ml de colesterol (agregado de una solución concentrada a 20 mg/ml en etanol). Como alimento, las cajas de NGM se inocularon con bacterias *E. Coli* de la cepa OP50-1 crecidas con estreptomycin; las bacterias crecieron toda la noche a 37 °C con agitación constante y luego fueron lavadas tres veces con agua MilliQ antes de sembrar las cajas. Las cajas con bacterias fueron incubadas una noche a temperatura ambiente antes de utilizarse para propagar a los nemátodos. En las condiciones de bajo colesterol, el colesterol fue omitido de las cajas NGM, pero la misma cantidad de etanol fue agregado al medio antes de ser esterilizado.

Ensayos de sensibilidad al colesterol

Puesto que los esteroides de la madre pueden pasar a la progenie, todos los experimentos fueron hechos en la filial 2 (F2) de gusanos creciendo en medio NGM sin complementación de colesterol y comparados con gusanos creciendo en condiciones normales.

Para cuantificar la fertilidad de las distintas cepas, se colocó una sola hermafrodita L4 en una caja NGM de 35 mm, el nemátodo fue transferido a una caja nueva cada 24 h hasta que no se detectó la presencia de embriones en la

[⌘] NGM: 35 mM NaCl, 22 mM KH₂PO₄, 2.8 mM K₂PO₄, 4% Bactopectona, 20 µM colesterol
Nota: las secuencias de todos los oligonucleótidos esta escrita dirección 5' -> 3'

caja. Los embriones de cada día fueron sumados (4-5 días) para calcular la fertilidad, también se cuantificó el porcentaje de embriones eclosionados a las 24 h respecto al total de embriones para calcular la letalidad embrionaria. De igual manera, se cuantifico el porcentaje de larvas L1 que llegaron a la etapa adulta al cabo de 5 días para calcular el porcentaje de desarrollo.

Algunos gusanos fueron usados para disecar las gónadas las cuales fueron fijadas después de ser incubadas con el colorante de núcleos DAPI. Las gónadas fijadas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 con un aumento de 40X y con una cámara AxioCam-MRc (Zeiss) acoplada.

Para cuantificar el tamaño de los gusanos, cuatro hermafroditas L4 fueron transferidos a una caja NGM de 60 mm, al cabo de una noche los animales fueron retirados. De la progenie fueron tomados animales cada 24 h, los cuales son representativos de cada etapa larvaria. Los animales fueron fijados en PFA al 4% y las imágenes fueron tomadas en un microscopio Olympus FV-10 con un objetivo 10X. El área de cada gusano fue cuantificada con el software FluoView V2.1

Para la cuantificación de larvas dauers, 12-15 adultos fueron sembrado en una caja NGM de 60mm (con comida) e incubados a 25 °C por 14-15 días. Posteriormente, los animales fueron colectados en buffer M9[✓] y contados. 2000 gusanos fueron tratados con una solución de SDS al 1% en M9 por 30 min y luego sembrados en cajas NGM nuevas; después de 2 h, los animales que sobrevivieron el tratamiento con SDS fueron cuantificados como dauers.

Para las mediciones de velocidad, un área de 12 cm cuadrados de una caja NGM de 60 mm fue delimitada con papel Whatman No.1, el cual fue humedecido con

[✓] M9: 22 mM KH₂PO₄, 42 mM Na₂HPO₄, 85.5 mM NaCl, 1 mM MgSO₄.

una solución de CuCl_2 50 mM que tiene la propiedad de repeler a los nemátodos. 20 gusanos fueron transferidos a estas cajas y 8-10 min de video fueron videograbados (320 x 240 pixeles, 3 fps) en un microscopio estereoscópico Nikon con una cámara digital acoplada. Los gusanos individuales fueron identificados automáticamente con el software Parallele WormTraker¹³⁶ usando los siguientes parámetros: área por gusano: de 16 a 40 pixeles, máxima distancia viajada por gusano: 20 pixeles; máximo cambio de tamaño: 25 pixeles, camino válido más corto: 70 cuadros. Con las trayectorias de los gusanos individuales identificadas, la velocidad fue calculada con el software WormAnalyzer¹³⁶ calibrado a 17.5 pixeles/mm.

Ensayos de Termorresistencia, por lo menos 20 gusanos adultos de un día fueron seleccionados y transferidos a cajas de NGM de 35 mm. Las cajas fueron incubadas en seco a 35 °C por 1 hora, al cabo de la cual la viabilidad de los gusanos fue evaluada tocándolos levemente para registrar movimiento. La viabilidad de los gusanos fue evaluada cada hora hasta que todos los gusanos estaban muertos.

Marcaje *in vivo* de colesterol

Los análogos de colesterol NBD o DHE fueron agregados a las bacterias lavadas (OP50-1 o HB115 con antibióticos) antes de sembrarlas en cajas de NGM de 35 mm. Las concentraciones finales fueron 30 μM para el NBD y 10 μM para el DHE (cada uno a partir de soluciones frescas 10,000X en etanol). Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente toda la noche protegidas de la luz con papel aluminio y guardadas a 4 °C hasta por una semana. Una hermafrodita L4 fue transferida a estas cajas; después de 96 h a 20 °C, la progenie fue colectada y lavada con M9 para después ser fijada con PFA 3% por 30 min a temperatura ambiente. Los animales fijados fueron lavados con agua y la señal residual del PFA fue neutralizada con una incubación con glicina 100 mM. Los gusanos fueron

montados con Dako para ser evaluados en un microscopio confocal Olympus FV-1000 (Spectral Laser Scanning Confocal Microscope) con un objetivo 40X N.A 1.3 oil. Los parámetros de GFP fueron usados para adquirir la señal del NBD y los parámetros de DAPI para el DHE. Las imágenes fueron adquiridas de manera secuencial con el software FV10-AW 2.1. Para los ensayos de densitometría, las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 (objetivo 10X) con un filtro Endow GFP HYQ Filter Cube (ex 450/490, 495DM, em 500/550) acoplado. Para la densitometría del canal verde el software ImageJ¹³⁷ fue utilizado con la opción “*Measure RGB*”. Previo a la medición, la señal de fondo fue restada de cada imagen de manera individual. Las diferencias fueron evaluadas por ANOVA de una vía, seguido por comparaciones múltiples de Bonferroni usando el programa GraphPad.

Incorporación de colesterol radioactivo.

El colesterol tritiado [3H]-colesterol fue agregado a las bacterias OP50-1 a una concentración de 250 nM; 400 uL fueron sembrados en cajas NGM de 60 mm las cuales se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. 4 animales adultos fueron transferidos a estas cajas e incubados a 20 °C toda la noche, posteriormente los animales adultos fueron retirados. Al cabo de 3-4 días, la progenie adulta fue colectada en grupos de 10 gusanos y lisados en “*worm lysis buffer*” con Proteinasa K (0.33 mg/mL) por 1 hora a 55 °C. El lisado de gusanos fue transferido a viales de vidrio y 3 mL de líquido de centelleo fueron agregados. Las cuentas por minuto (*c.p.m*) fueron cuantificadas en un Contador de Centelleo Beckman-Coulter LS 6500.

RNA de interferencia

El mensajero de *cup-1* fue amplificado de una biblioteca de cDNA usando los oligonucleótidos atgaggacctcacaggcg y ctagaaaactcgaattgtattcc, posteriormente un

fragmento HindIII/HindIII (530 pb) fue clonado en el vector pPD129.36, dicho plásmido tiene dos promotores T7 invertidos flanqueando el sitio múltiple de clonación. Esta construcción fue transformada en la cepa de *E. Coli* HT115 que expresa a la polimerasa de T7 de manera inducible por IPTG. Estas bacterias fueron usadas como comida, sembrándolas en cajas NGM adicionadas con antibióticos (ampicilina y tetraciclina) y 1 mM de IPTG para inducir a la polimerasa T7 la que a su vez produce RNA de doble cadena¹³⁸. Para evaluar la incorporación de NBD, este fue agregado a las bacterias HT115 a una concentración de 30 nM e incubadas una noche a temperatura ambiente antes de sembrar 4 hermafroditas L4; la progenie adulta de éstos fue colectada con M9 y fijada con PFA al 3% (60 min a 4 °C) y luego fijados para ser evaluados por microscopia confocal (Microscopio Olympus FV-1000). La eficiencia del RNAi fue corroborada por RT-PCR en tiempo real usando *sybergreen* (Invitrogen) y los siguientes oligonucleótidos: atgaggacctcacaggcgatt and gtacaccacatcccatttcgct. Como control negativo se alimentaron gusanos con el plásmido vacío pPD129.36.

Expresión de CUP-1::GFP en células de mamíferos

El codón de termino fue eliminado mediante PCR usando los siguientes oligonucleótidos: tctagaatgaggacctcacaggcg y ggatcccctccgaaaactcgaattgtattcc. El producto obtenido fue clonado en marco en el vector pEGFP-N1 (Clontech). Para la expresión de la proteína quimérica, 1 µg de plásmido pEGFPN1+CUP-1 (purificado por columna de Qiagene) se transfectó en células HEK293-FT usando Lipofectamine/PLUS (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante; las células estaban creciendo en cajas de 35 mm en medio Optimem sin suero al momento de la transfección. Al cabo de 24 h, las células se tripzinizaron y se sembraron en cubre-objetos redondos; se mantuvieron a 37 °C, 5% CO₂ en medio DMEM suplementado con glutamina, piruvato y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Los cubreobjetos con las células transfectadas se cultivaron por 24-36 h antes de incubarlo con FM4-64 (1 min o 3 hrs), LysoTracker (1 h) o

DHE 10 μ M (30 min) en Optimem. Los cubreobjetos fueron cambiados de medio y montados en Optimem en una cámara de incubación (INU-ZIL-F1, TOKAI HIT, Japan) a 37 °C. Las imágenes *in vivo* fueron adquiridas en un microscopio confocal Olympus FV-1000 SLS (objetivo 60X N.A. 1.45 oil immersion, zoom 5, Kalman filter 2). El análisis de las imágenes se hizo con ImageJ usando el módulo "Image Correlation Analysis"¹³⁹; el fondo fue restado a cada canal antes de la medición usando al canal verde como región de interés. A las imágenes con valores PDM positivos, se les aplicó una tabla de pseudocolor RedFire. Los coeficientes de colocalización de Manders fueron calculados de las células GFP+ usando el módulo "Manders' Coefficients"¹³⁹ en el ImageJ. La inmunotinción de Golgi fue hecha con el anticuerpo anti-golina97 humana en células fijadas con PFA al 2% siguiendo las instrucciones del fabricante.

Expresión estable de hSIDT1::GFP y mSIDT2::GFP

hSIDT1 fue clonado de la clona de cDNA humana FLJ20174 del consorcio japonés Riken, usando los oligonucleótidos tcagatctgcaccgggcttggaa y gtggatcccagaagacagggatctgtctc que además, elimina el codón de termino. mSIDT2 fue clonado de una clona de cDNA adquirida de la compañía OpenBiosystems utilizando los oligonucleótidos agatctccggcagccgcaacg y taagcttcccgaagacatagatcttgtccc, que también remueve el codón de término. Ambas proteínas fueron clonadas en el vector pEGFP-N1 para generar las proteínas fusionadas a GFP. Posteriormente, las proteínas quiméricas fueron sub-clonadas en el plásmido LentiLox 3.7¹⁴⁰, quedando bajo el promotor de CMV. Este vector fue transfectado siguiendo el protocolo publicado en línea¹⁴¹. Brevemente; una caja de 10 cm con células HEK293 FT al 80% de confluencia fue transfetada con cloruro de calcio: 10 μ g LentiLox+gen_clonado, + 5 μ g de cada plásmido empacador (pMDLg/pRRE: genes gag/pol; pRSV-REV y pMD.G: genes env). El sobrenadante fue colectado a las 48 h y concentrado por ultracentrifugación (27,000 rpm, 1.5h, rotor Beckman SW-28), y empleado para transducir células HEK293 FT en presencia

de polibrenro. A las 36 h las células se sembraron en placas de 96 posos y se seleccionaron clonas por su expresión de GFP. De esta manera se obtuvieron dos líneas celulares que expresaban establemente a las proteínas SIDT1::GFP y SIDT2::GFP, las cuales fueron empleadas en los estudios de microscopia confocal y colocalización de organelos mediante un protocolo idéntico al previamente descrito para las células transfectadas con CUP-1::GFP.

Ensayo FRET

Las células transfectadas con CUP-1::GFP, o que expresaban de manera estable a SIDT1::GFP o SIDT2::GFP, fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 9x9 mm e incubadas con 5 μ M de DHE en Optimem (sin suero) por 35 min a 37 °C. Posteriormente las células fueron fijadas en PFA al 3% en PBS por 20 min a temperatura ambiente. Después de neutralizar con glicina 100 nM y extensivos lavados con PBS y agua, los cubreobjetos fueron montados con Dako. Para cuantificar la eficiencia de FRET en términos absolutos, el aceptor GFP fue fotoblanqueado y el aumento en la fluorescencia del donador DHE fue cuantificado siguiendo un protocolo previamente reportado¹⁰⁶. Brevemente, un área de aproximadamente el 50% de una célula GFP+ fue fotoblanqueada usando la función “Tornado” (laser 488 nm 40%, 1.5 s) en el microscopio Olympus FV-1000 (objetivo 60X). Tres imágenes consecutivas fueron tomadas antes y después del fotoblanqueo. La eficiencia de FRET fue calculada con la función: $[D_{post} - D_{pre}] / D_{post}$, donde D = Intensidad de fluorescencia del donador DHE; pre/post fotoblanqueo de la GFP. Las mutaciones de los motivos CRAC de CUP-1 fueron generadas mediante QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando los oligonucleótidos cacgtccagtgcattgcaatttccgtgcag y ctgcacggaaattgccatgcactggacgtg para el motivo extracelular y gtcagcctcgagttcggttcaagggaatctgg y ccagattccttgaaccgaactcgaggctgac para el transmembranal. Las diferencias en la eficiencia de FRET fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguida por post-test de Bonferroni; las diferencias fueron

indicadas por letras diferentes (a>b) donde $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Biotniliación de proteínas de membrana.

Este ensayo fue realizado con el kit “Cell Surface Protein Isolation” (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células que expresaban las distintas proteínas quiméricas fueron biotiniladas con el reactivo Sulfo-NHS-SS-Biotin que es impermeable y por lo tanto solo modifica a las proteínas expuestas en la MP. Posteriormente, las células son colectadas y lisadas y las proteínas biotiniladas son purificadas con una columna de Avidina-agarosa; las proteínas se eluyen de la comuna y son analizadas en un gel de poliacrilamida, sin hervir las muestras. Para detectar a las proteínas quiméricas se utilizó un anticuerpo primario anti-GFP (BD Living Colors™) y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa que fue revelado con el substrato SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce).

Ensayos de internalización de dsRNA radioactivo

El dsRNA fue obtenido mediante una reacción de retrotranscripción con la RNA polimerasa T7 (N.E.B.L) y $\alpha^{32}P$ UTP (Perkin Elmer): incubada a temperatura ambiente toda la noche. Como substrato se utilizó un producto de PCR (amplificado con oligonucleótido genérico de T7) obtenido del plásmido pPD129.36 que contenía un fragmento de un promotor murino^φ clonado entre los dos promotores invertidos. El producto de la retrotranscripción fue tratado con DNasaI y purificado para eliminar UTP libre. Células HEK293FT o PANC1 fueron transfectadas transitoriamente con las proteínas quiméricas, e incubadas con dsRNA radioactivo en Optimem a 37 °C a los tiempos indicados. Las células fueron lavadas con PBS ácido y lisadas en agua. La cantidad de marca radioactiva fue cuantificada en un contador de Centelleo (Beckman) y normalizada por la

^φ secuencia antisentido del promotor de Tyrosinase murina clonado de la cepa BALB/c.

cantidad de proteína de cada muestra. Para los ensayos con las células de *Drosophila* S2, las proteínas quiméricas se subclonaron en el vector inducible por cobre pRMHA3, el cual fue transfectado con el reactivo Effectene (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el ensayo de internalización de dsRNA se siguió un protocolo similar al de las células de mamífero excepto que fueron hechos a 28 °C en medio Schneider's (Invitrogen).

Expresión de SIDT1 y SIDT2 en ratón

Embriones de la cepa B57BL fueron colectados a los días indicados al igual que tejidos de ratones adultos. El RNA fue purificado utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Usando la enzima SuperScrip III y oligo dT, se generó cDNA de los distintos embriones y tejidos, el cual se uso para amplificar un fragmento de 239 pb de mSIDT1, oligonucleótidos agtgggtgtttggaaaaaacgatgtgtgg y caaaggaccaattaaccagatttcccacaatg, y un fragmento de 224 pb de mSIDT2 con ggcaaaggggaacacggcc y gaccagttgataatgttgcccatgacc. Las T_m promedio de cada par es de: 60.7 ± 0.1 °C y 60.4 ± 0.3 °C, respectivamente. Como control, se amplificó un fragmento de GAPDH de 230 nt (Oligonucleótidos: gacatcaagaaggtgtgaagc y ttactccttgaggccatgtag; T_m : 57 ± 0.1 °C). Los fragmentos amplificados fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con SyberSafe y analizados en un Typhoon scanner (GE Life Sciences). La densitometría de cada banda fue cuantificada con el software ImageQuant (GE) y normalizada por la expresión de GAPDH.

Hibridización *in situ* de embriones de ratón

Un fragmento (350nt) del 3'-UTR de mSIDT2 fue amplificado por PCR de cDNA de ratón Balb/c con los siguientes oligonucleótidos: gacgttgatgacgacttggac y agatggacagactagggtcctg. La sonda fue clonada en el vector pDrive y la secuencia antisentido transcrita con la RNA polimerasa T7 y DIG-UTP (Roche) previa linearización del plásmido. Para la hibridización *in situ* de embriones de ratón se

emplearon embriones de la cepa B57BL siguiendo el protocolo: “RNA Whole Mount In Situ Hybridization” publicado en línea¹⁴².



9. REFERENCIAS

- 1 Byers, S. O., Friedman, M. & St George, S. Cholesterol metabolism. *Annu Rev Biochem* **25**, 613-640, doi:10.1146/annurev.bi.25.070156.003145 (1956).
- 2 Yeagle, P. L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* **822**, 267-287 (1985).
- 3 Chang, T. Y., Chang, C. C., Ohgami, N. & Yamauchi, Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 129-157, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656 (2006).
- 4 Huang, J. & Feigenson, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J* **76**, 2142-2157, doi:S0006-3495(99)77369-8 [pii] 10.1016/S0006-3495(99)77369-8 (1999).
- 5 Edidin, M. Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts. *Sci STKE* **2001**, pe1, doi:10.1126/stke.2001.67.pe1 2001/67/pe1 [pii] (2001).
- 6 Hamilton, J. A. Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes: implications for membrane transport proteins. *Curr Opin Lipidol* **14**, 263-271, doi:10.1097/01.mol.0000073507.41685.9b (2003).
- 7 Maekawa, S., Iino, S. & Miyata, S. Molecular characterization of the detergent-insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 261-270, doi:S0005273603000233 [pii] (2003).
- 8 Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 210-222, doi:S1388-1981(00)00150-5 [pii] (2000).
- 9 Pellicoro, A. & Faber, K. N. Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment Pharmacol Ther* **26 Suppl 2**, 149-160, doi:APT3522 [pii] 10.1111/j.1365-2036.2007.03522.x (2007).
- 10 Meier, P. J. & Stieger, B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* **64**, 635-661, doi:10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300 64/1/635 [pii] (2002).

- 11 Kametani, T. & Furuyama, H. Synthesis of vitamin D3 and related compounds. *Med Res Rev* **7**, 147-171 (1987).
- 12 Holick, M. F. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res* **164**, 3-28 (2003).
- 13 Schroepfer, G. J., Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* **80**, 361-554 (2000).
- 14 Miller, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* **9**, 295-318 (1988).
- 15 Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125-138, doi:nrm2336 [pii] 10.1038/nrm2336 (2008).
- 16 Singh, R. R. & Kumar, R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem* **96**, 490-505, doi:10.1002/jcb.20566 (2005).
- 17 Baulieu, E. E. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23**, 963-987, doi:S0306-4530(98)00071-7 [pii] (1998).
- 18 Plassart-Schiess, E. & Baulieu, E. E. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* **37**, 133-140, doi:S0165017301001138 [pii] (2001).
- 19 Robel, P. & Baulieu, E. E. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Crit Rev Neurobiol* **9**, 383-394 (1995).
- 20 Green, J. M. *et al.* Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* **146**, 673-682 (1999).
- 21 McPherson, R. Function of cholesteryl ester transfer protein in reverse cholesterol transport. *CMAJ* **148**, 2165-2166 (1993).
- 22 Bazan, J. F. & de Sauvage, F. J. Structural ties between cholesterol transport and morphogen signaling. *Cell* **138**, 1055-1056, doi:S0092-8674(09)01121-0 [pii] 10.1016/j.cell.2009.09.006 (2009).
- 23 Jiang, J. & Hui, C. C. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* **15**, 801-812, doi:S1534-5807(08)00484-X [pii] 10.1016/j.devcel.2008.11.010 (2008).
- 24 Wicking, C., Smyth, I. & Bale, A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* **18**, 7844-7851, doi:10.1038/sj.onc.1203282 (1999).
- 25 Jeong, J. & McMahon, A. P. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest* **110**, 591-596, doi:10.1172/JCI16506 (2002).
- 26 Eaton, S. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 437-445, doi:nrm2414 [pii] 10.1038/nrm2414 (2008).
- 27 Huber, T. B. *et al.* Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17079-17086, doi:0607465103 [pii] 10.1073/pnas.0607465103 (2006).
- 28 Bukiya, A. N., Belani, J. D., Rychnovsky, S. & Dopico, A. M. Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *J Gen Physiol* **137**, 93-110, doi:jgp.201010519 [pii] 10.1085/jgp.201010519 (2011).
- 29 Ye, J. & DeBose-Boyd, R. A. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a004754 a004754 [pii] cshperspect.a004754 [pii] (2011).

- 30 Dietary cholesterol and regulation of liver cholesterol synthesis. *Nutr Rev* **24**, 218-220 (1966).
- 31 Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **109**, 1125-1131, doi:10.1172/JCI15593 (2002).
- 32 Rutledge, A. C., Su, Q. & Adeli, K. Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochem Cell Biol* **88**, 251-267, doi:o09-168 [pii] 10.1139/o09-168 (2010).
- 33 Tiwari, S. & Siddiqi, S. A. Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1079-1086, doi:32/5/1079 [pii] 10.1161/ATVBAHA.111.241471 (2012).
- 34 Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L. & Brown, M. S. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem* **250**, 8487-8495 (1975).
- 35 Goldstein, J. L. & Brown, M. S. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 431-438, doi:ATVBAHA.108.179564 [pii] 10.1161/ATVBAHA.108.179564 (2009).
- 36 Scott, C. & Ioannou, Y. A. The NPC1 protein: structure implies function. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 8-13, doi:S1388-1981(04)00129-5 [pii] 10.1016/j.bbaliip.2004.08.006 (2004).
- 37 Blanchette-Mackie, E. J. Intracellular cholesterol trafficking: role of the NPC1 protein. *Biochim Biophys Acta* **1486**, 171-183, doi:S1388-1981(00)00055-X [pii] (2000).
- 38 Ledesma, M. D., Prinetti, A., Sonnino, S. & Schuchman, E. H. Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J Neurochem* **116**, 779-788, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07034.x (2011).
- 39 Passeggio, J. & Liscum, L. Flux of fatty acids through NPC1 lysosomes. *J Biol Chem* **280**, 10333-10339, doi:M413657200 [pii] 10.1074/jbc.M413657200 (2005).
- 40 Vanier, M. T. & Millat, G. Structure and function of the NPC2 protein. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 14-21, doi:S1388-1981(04)00130-1 [pii] 10.1016/j.bbaliip.2004.08.007 (2004).
- 41 Kwon, H. J. *et al.* Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* **137**, 1213-1224, doi:S0092-8674(09)00393-6 [pii] 10.1016/j.cell.2009.03.049 (2009).
- 42 Sturley, S. L. Molecular aspects of intracellular sterol esterification: the acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase reaction. *Curr Opin Lipidol* **8**, 167-173 (1997).
- 43 Ikonen, E., Heino, S. & Lusa, S. Caveolins and membrane cholesterol. *Biochem Soc Trans* **32**, 121-123, doi:10.1042/ (2004).
- 44 Clark, B. J. The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *J Endocrinol* **212**, 257-275, doi:JOE-11-0313 [pii] 10.1530/JOE-11-0313 (2012).
- 45 Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A. & Hurley, J. H. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature* **437**, 154-158, doi:nature03923 [pii] 10.1038/nature03923 (2005).
- 46 Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* **49**, 251-264, doi:S0169409X01001405 [pii] (2001).

- 47 Lund-Katz, S. & Phillips, M. C. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem* **51**, 183-227, doi:10.1007/978-90-481-8622-8_7 (2010).
- 48 Van Eck, M., Pennings, M., Hoekstra, M., Out, R. & Van Berkel, T. J. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **16**, 307-315, doi:00041433-200506000-00008 [pii] (2005).
- 49 Dobiasova, M. & Frohlich, J. J. Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clin Chim Acta* **286**, 257-271 (1999).
- 50 Thuahnai, S. T. *et al.* Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure. *J Biol Chem* **279**, 12448-12455, doi:10.1074/jbc.M311718200 M311718200 [pii] (2004).
- 51 Bosner, M. S., Lange, L. G., Stenson, W. F. & Ostlund, R. E., Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* **40**, 302-308 (1999).
- 52 Kuwabara, P. E. & Labouesse, M. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* **18**, 193-201, doi:S0168952502026409 [pii] (2002).
- 53 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**, 4991-4997 (1998).
- 54 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**, 569-573, doi:S0006-291X(10)02256-4 [pii] 10.1016/j.bbrc.2010.12.031 (2011).
- 55 Singh, A. K. *et al.* Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in the cytosolic C tail of the slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca²⁺- and voltage-gated K⁺ (BK) channels. *J Biol Chem*, doi:M112.356261 [pii] 10.1074/jbc.M112.356261 (2012).
- 56 Oddi, S. *et al.* Functional characterization of putative cholesterol binding sequence (CRAC) in human type-1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* **116**, 858-865, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07041.x (2011).
- 57 Schroeder, C. Cholesterol-binding viral proteins in virus entry and morphogenesis. *Subcell Biochem* **51**, 77-108, doi:10.1007/978-90-481-8622-8_3 (2010).
- 58 Jamin, N. *et al.* Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol* **19**, 588-594, doi:me.2004-0308 [pii] 10.1210/me.2004-0308 (2005).
- 59 Epand, R. M. Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res* **45**, 279-294, doi:S0163-7827(06)00015-4 [pii] 10.1016/j.plipres.2006.02.001 (2006).
- 60 Epand, R. M. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1576-1582, doi:S0005-2736(08)00120-X [pii] 10.1016/j.bbamem.2008.03.016 (2008).
- 61 Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
- 62 Wilson, R. K. How the worm was won. The *C. elegans* genome sequencing project. *Trends Genet* **15**, 51-58, doi:S0168952598016667 [pii] (1999).

- 63 Duveau, F. & Felix, M. A. Evolution of sex determination in *C. elegans*. Hidden variation mapped. *Heredity (Edinb)* **105**, 423-425, doi:hdy201099 [pii] 10.1038/hdy.2010.99 (2010).
- 64 Ambros, V. The temporal control of cell cycle and cell fate in *Caenorhabditis elegans*. *Novartis Found Symp* **237**, 203-214; discussion 214-220 (2001).
- 65 Zheng, J. & Greenway, F. L. *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. *Int J Obes (Lond)* **36**, 186-194, doi:10.1038/ijo.2011.93 ijo201193 [pii] (2012).
- 66 Chang, C. & Sternberg, P. W. *C. elegans* vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev* **18**, 203-213 (1999).
- 67 Sengupta, P. & Samuel, A. D. *Caenorhabditis elegans*: a model system for systems neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 637-643, doi:S0959-4388(09)00133-0 [pii] 10.1016/j.conb.2009.09.009 (2009).
- 68 Edgar, R. S., Cox, G. N., Kusch, M. & Politz, J. C. The Cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol* **14**, 248-258 (1982).
- 69 Franks, C. J., Holden-Dye, L., Bull, K., Luedtke, S. & Walker, R. J. Anatomy, physiology and pharmacology of *Caenorhabditis elegans* pharynx: a model to define gene function in a simple neural system. *Invert Neurosci* **6**, 105-122, doi:10.1007/s10158-006-0023-1 (2006).
- 70 McGhee, J. D. The *C. elegans* intestine. *WormBook*, 1-36, doi:10.1895/wormbook.1.133.1 (2007).
- 71 Marcello, M. R. & Singson, A. Fertilization and the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *BMB Rep* **43**, 389-399 (2010).
- 72 Emmons, S. W. Sexual behavior of the *Caenorhabditis elegans* male. *Int Rev Neurobiol* **69**, 99-123, doi:S0074-7742(05)69004-6 [pii] 10.1016/S0074-7742(05)69004-6 (2006).
- 73 Zaidel-Bar, R., Miller, S., Kaminsky, R. & Broday, L. Molting-specific downregulation of *C. elegans* body-wall muscle attachment sites: the role of RNF-5 E3 ligase. *Biochem Biophys Res Commun* **395**, 509-514, doi:S0006-291X(10)00718-7 [pii] 10.1016/j.bbrc.2010.04.049 (2010).
- 74 Wang, Y., Ezemaduka, A. N., Tang, Y. & Chang, Z. Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of *C. elegans*: from genetics to biochemistry. *IUBMB Life* **61**, 607-612, doi:10.1002/iub.211 (2009).
- 75 Kurzchalia, T. V. & Ward, S. Why do worms need cholesterol? *Nat Cell Biol* **5**, 684-688, doi:10.1038/ncb0803-684 ncb0803-684 [pii] (2003).
- 76 Chitwood, D. J. & Lusby, W. R. Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* **26**, 619-627 (1991).
- 77 Brooks, K. K., Liang, B. & Watts, J. L. The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PLoS One* **4**, e7545, doi:10.1371/journal.pone.0007545 (2009).
- 78 Matyash, V. *et al.* Distribution and transport of cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **12**, 1725-1736 (2001).
- 79 Merris, M. *et al.* Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans*: developmental requirement for 4 α -methyl sterols. *J Lipid Res* **44**, 172-181 (2003).
- 80 Entchev, E. V. & Kurzchalia, T. V. Requirement of sterols in the life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 175-182, doi:S1084-9521(05)00020-0 [pii] 10.1016/j.semcdb.2005.01.004 (2005).

- 81 Merris, M., Kraeft, J., Tint, G. S. & Lenard, J. Long-term effects of sterol depletion in *C. elegans*: sterol content of synchronized wild-type and mutant populations. *J Lipid Res* **45**, 2044-2051, doi:10.1194/jlr.M400100-JLR200 M400100-JLR200 [pii] (2004).
- 82 Shim, Y. H., Chun, J. H., Lee, E. Y. & Paik, Y. K. Role of cholesterol in germ-line development of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Reprod Dev* **61**, 358-366, doi:10.1002/mrd.10099 [pii] 10.1002/mrd.10099 (2002).
- 83 Yochem, J., Tuck, S., Greenwald, I. & Han, M. A gp330/megalin-related protein is required in the major epidermis of *Caenorhabditis elegans* for completion of molting. *Development* **126**, 597-606 (1999).
- 84 Kuervers, L. M., Jones, C. L., O'Neil, N. J. & Baillie, D. L. The sterol modifying enzyme LET-767 is essential for growth, reproduction and development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Genomics* **270**, 121-131, doi:10.1007/s00438-003-0900-9 (2003).
- 85 Matyash, V. *et al.* Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. *PLoS Biol* **2**, e280, doi:10.1371/journal.pbio.0020280 (2004).
- 86 Martin, R., Entchev, E. V., Kurzchalia, T. V. & Knolker, H. J. Steroid hormones controlling the life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: stereoselective synthesis and biology. *Org Biomol Chem* **8**, 739-750, doi:10.1039/b918488k (2010).
- 87 Whitfield, G. K., Jurutka, P. W., Haussler, C. A. & Haussler, M. R. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**, 110-122, doi:10.1002/(SICI)1097-4644(1999)75:32+<110::AID-JCB14>3.0.CO;2-T [pii] (1999).
- 88 Sym, M., Basson, M. & Johnson, C. A model for niemann-pick type C disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **10**, 527-530, doi:S0960-9822(00)00468-1 [pii] (2000).
- 89 Li, J., Brown, G., Ailion, M., Lee, S. & Thomas, J. H. NCR-1 and NCR-2, the *C. elegans* homologs of the human Niemann-Pick type C1 disease protein, function upstream of DAF-9 in the dauer formation pathways. *Development* **131**, 5741-5752, doi:131/22/5741 [pii] 10.1242/dev.01408 (2004).
- 90 Wustner, D., Landt Larsen, A., Faergeman, N. J., Brewer, J. R. & Sage, D. Selective visualization of fluorescent sterols in *Caenorhabditis elegans* by bleach-rate-based image segmentation. *Traffic* **11**, 440-454, doi:TRA1040 [pii] 10.1111/j.1600-0854.2010.01040.x (2010).
- 91 Fisher, C. E. & Howie, S. E. The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev Biol* **296**, 279-297, doi:S0012-1606(06)00906-7 [pii] 10.1016/j.ydbio.2006.06.007 (2006).
- 92 Grant, B. & Hirsh, D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell* **10**, 4311-4326 (1999).
- 93 MacMorris, M. *et al.* Regulation of vitellogenin gene expression in transgenic *Caenorhabditis elegans*: short sequences required for activation of the vit-2 promoter. *Mol Cell Biol* **12**, 1652-1662 (1992).
- 94 Stefani, M. & Liguri, G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Curr Alzheimer Res* **6**, 15-29 (2009).
- 95 Camon, E. *et al.* The Gene Ontology Annotation (GOA) project: implementation of GO in SWISS-PROT, TrEMBL, and InterPro. *Genome Res* **13**, 662-672, doi:10.1101/gr.461403 GR-4614R [pii] (2003).

- 96 Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447, doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800 121801.161800 [pii] (2003).
- 97 Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G. & Papadopoulos, V. Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1267-1272, doi:10.1073/pnas.031461598 031461598 [pii] (2001).
- 98 Lee, E. Y. *et al.* Effects of sterols on the development and aging of *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol* **462**, 167-179 (2009).
- 99 Lee, E. Y. *et al.* Cholesterol-producing transgenic *Caenorhabditis elegans* lives longer due to newly acquired enhanced stress resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 929-936, doi:S0006-291X(05)00106-3 [pii] 10.1016/j.bbrc.2005.01.050 (2005).
- 100 Fares, H. & Greenwald, I. Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* **159**, 133-145 (2001).
- 101 McIntosh, A. L. *et al.* Fluorescence techniques using dehydroergosterol to study cholesterol trafficking. *Lipids* **43**, 1185-1208, doi:10.1007/s11745-008-3194-1 (2008).
- 102 Manders, E. J., V. F. & ATEN, J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* **169**, 375-382 (1993).
- 103 Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nat Biotechnol* **21**, 1387-1395, doi:10.1038/nbt896 nbt896 [pii] (2003).
- 104 Rasnik, I., McKinney, S. A. & Ha, T. Surfaces and orientations: much to FRET about? *Acc Chem Res* **38**, 542-548, doi:10.1021/ar040138c (2005).
- 105 Miyawaki, A. & Tsien, R. Y. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **327**, 472-500 (2000).
- 106 Kenworthy, A. K. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**, 289-296, doi:10.1006/meth.2001.1189 S1046-2023(01)91189-2 [pii] (2001).
- 107 Tomoyasu, Y. *et al.* Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol* **9**, R10, doi:gb-2008-9-1-r10 [pii] 10.1186/gb-2008-9-1-r10 (2008).
- 108 Feinberg, E. H. & Hunter, C. P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**, 1545-1547, doi:10.1126/science.1087117 301/5639/1545 [pii] (2003).
- 109 Zallen, J. A., Kirch, S. A. & Bargmann, C. I. Genes required for axon pathfinding and extension in the *C. elegans* nerve ring. *Development* **126**, 3679-3692 (1999).
- 110 Morcos, M. & Hutter, H. The model *Caenorhabditis elegans* in diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**, 897-908, doi:D6605144139024L0 [pii] 10.3233/JAD-2009-0977 (2009).
- 111 Sandilands, E. *et al.* RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell* **7**, 855-869, doi:S1534580704003831 [pii] 10.1016/j.devcel.2004.09.019 (2004).
- 112 Scott, C., Higgins, M. E., Davies, J. P. & Ioannou, Y. A. Targeting of NPC1 to late endosomes involves multiple signals, including one residing within the putative sterol-sensing domain. *J Biol Chem* **279**, 48214-48223, doi:10.1074/jbc.M406090200

- M406090200 [pii] (2004).
- 113 Lacapere, J. J. & Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* **68**, 569-585, doi:S0039128X03001016 [pii] (2003).
- 114 Betterers, J. L. & Yu, L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett* **584**, 2740-2747, doi:S0014-5793(10)00242-5 [pii] 10.1016/j.febslet.2010.03.030 (2010).
- 115 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, doi:10.1371/journal.pone.0033962 PONE-D-11-19607 [pii] (2012).
- 116 Adams, M. R., Konaniah, E., Cash, J. G. & Hui, D. Y. Use of NBD-cholesterol to identify a minor but NPC1L1-independent cholesterol absorption pathway in mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G164-169, doi:ajpgi.00392.2010 [pii] 10.1152/ajpgi.00392.2010 (2011).
- 117 Dietschy, J. M. & Turley, S. D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* **45**, 1375-1397, doi:10.1194/jlr.R400004-JLR200 R400004-JLR200 [pii] (2004).
- 118 Koudinov, A. R. & Koudinova, N. V. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J* **15**, 1858-1860 (2001).
- 119 Sooksawate, T. & Simmonds, M. A. Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Neuropharmacology* **40**, 178-184, doi:S0028390800001593 [pii] (2001).
- 120 Saher, G. *et al.* High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* **8**, 468-475, doi:nn1426 [pii] 10.1038/nn1426 (2005).
- 121 Morell, P. & Jurevics, H. Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem Res* **21**, 463-470 (1996).
- 122 Bales, K. R. Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **59**, 295-302, doi:S0028-3908(10)00007-9 [pii] 10.1016/j.neuropharm.2010.01.005 (2010).
- 123 Mauch, D. H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354-1357, doi:10.1126/science.294.5545.1354 294/5545/1354 [pii] (2001).
- 124 Roux, C. *et al.* Role of cholesterol in embryonic development. *Am J Clin Nutr* **71**, 1270S-1279S (2000).
- 125 Vaya, J. & Schipper, H. M. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem* **102**, 1727-1737, doi:JNC4689 [pii] 10.1111/j.1471-4159.2007.04689.x (2007).
- 126 Jeitner, T. M., Voloshyna, I. & Reiss, A. B. Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders. *Curr Med Chem* **18**, 1515-1525, doi:BSP/CMC/E-Pub/2011/102 [pii] (2011).
- 127 Gu, F., Crump, C. M. & Thomas, G. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1067-1084 (2001).
- 128 Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T. & Murray, C. J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**, 1747-1757, doi:S0140-6736(06)68770-9 [pii] 10.1016/S0140-6736(06)68770-9 (2006).

- 129 The statins: potent drugs to lower cholesterol. *Harv Mens Health Watch* **3**, 3-4 (1998).
- 130 Cibickova, L. Statins and their influence on brain cholesterol. *J Clin Lipidol* **5**, 373-379, doi:10.1016/j.jacl.2011.06.007
S1933-2874(11)00614-3 [pii] (2011).
- 131 Fonseca, A. C., Resende, R., Oliveira, C. R. & Pereira, C. M. Cholesterol and statins in Alzheimer's disease: current controversies. *Exp Neurol* **223**, 282-293, doi:S0014-4886(09)00387-2 [pii]
10.1016/j.expneurol.2009.09.013 (2010).
- 132 Chang, T. Y. & Chang, C. Ezetimibe blocks internalization of the NPC1L1/cholesterol complex. *Cell Metab* **7**, 469-471, doi:S1550-4131(08)00145-9 [pii]
10.1016/j.cmet.2008.05.001 (2008).
- 133 Karasinska, J. M. & Hayden, M. R. Cholesterol metabolism in Huntington disease. *Nat Rev Neurol* **7**, 561-572, doi:10.1038/nrneurol.2011.132
nrneurol.2011.132 [pii] (2011).
- 134 Cholesterol, the mind, and the brain. *Harv Mens Health Watch* **11**, 1-4 (2007).
- 135 Harris, J. R. & Milton, N. G. Cholesterol in Alzheimer's disease and other amyloidogenic disorders. *Subcell Biochem* **51**, 47-75, doi:10.1007/978-90-481-8622-8_2 (2010).
- 136 Ramot, D., Johnson, B. E., Berry, T. L., Jr., Carnell, L. & Goodman, M. B. The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PLoS One* **3**, e2208, doi:10.1371/journal.pone.0002208 (2008).
- 137 Collins, T. J. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* **43**, 25-30, doi:000112517 [pii] (2007).
- 138 Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G. & Ahringer, J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0002 (2001).
- 139 Li, Q. *et al.* A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* **24**, 4070-4081, doi:10.1523/JNEUROSCI.0346-04.2004
24/16/4070 [pii] (2004).
- 140 Rubinson, D. A. *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* **33**, 401-406, doi:10.1038/ng1117
ng1117 [pii] (2003).
- 141 ScienceGateway. Lentiviral RNAi Protocols
<http://www.sciencegateway.org/protocols/lentivirus/index.htm>.
- 142 CepkoTabin, L. RNA Whole Mount In Situ Hybridization,
<<http://genepath.med.harvard.edu/~cepko/protocol/ctlab/ish.ct.htm>> (

APÉNDICE:

Valdes VJ. et. al. “CUP-1 is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis elegans*” PLoS One. 2012;7(3):e33962. Epub 2012 Mar 27.

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

CUP-1 Is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis elegans*

Victor J. Valdes, Alejandro Athie, Laura S. Salinas, Rosa E. Navarro*, Luis Vaca*

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF, México

Abstract

Sterols transport and distribution are essential processes in all multicellular organisms. Survival of the nematode *Caenorhabditis elegans* depends on dietary absorption of sterols present in the environment. However the general mechanisms associated to sterol uptake in nematodes are poorly understood. In the present work we provide evidence showing that a previously uncharacterized transmembrane protein, designated Cholesterol Uptake Protein-1 (CUP-1), is involved in dietary cholesterol uptake in *C. elegans*. Animals lacking CUP-1 showed hypersensitivity to cholesterol limitation and were unable to uptake cholesterol. A CUP-1-GFP fusion protein colocalized with cholesterol-rich vesicles, endosomes and lysosomes as well as the plasma membrane. Additionally, by FRET imaging, a direct interaction was found between the cholesterol analog DHE and the transmembrane “cholesterol recognition/interaction amino acid consensus” (CRAC) motif present in *C. elegans* CUP-1. *In-silico* analysis identified two mammalian homologues of CUP-1. Most interestingly, CRAC motifs are conserved in mammalian CUP-1 homologues. Our results suggest a role of CUP-1 in cholesterol uptake in *C. elegans* and open up the possibility for the existence of a new class of proteins involved in sterol absorption in mammals.

Citation: Valdes VJ, Athie A, Salinas LS, Navarro RE, Vaca L (2012) CUP-1 Is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE 7(3): e33962. doi:10.1371/journal.pone.0033962

Editor: Vladimir N. Uversky, University of South Florida College of Medicine, United States of America

Received: October 4, 2011; **Accepted:** February 22, 2012; **Published:** March 27, 2012

Copyright: © 2012 Valdes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was supported by grants from Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (IGTDF), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) and CONACYT to VL and CONACYT 103856-Q and PAPIIT INQ25500 to NRE. CONACYT supported VV. This study was performed in partial fulfillment of the requirement for the PhD degree in Biomedical Sciences of VV at the Universidad Nacional Autónoma de México. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vaca@ic.unam.mx (LV); navarro@ic.unam.mx (REN)

Introduction

Sterols are essential for eukaryotic cells and many cellular processes depend directly or indirectly on them. In the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, cholesterol is involved in important biological functions, including growth control and reproduction. Its supply is essential for the production of sterol-derived hormones (e.g. dafachronic acids/gamraval), which regulate development and mating behavior [1–4]. Cholesterol has been also proposed as a protein modifier of important signaling molecules, modulating its activity and transport [5,6].

Nematodes are auxotrophic for sterols; they cannot synthesize lanosterol and squalene, key metabolites in sterol biosynthesis [7]. Consequently, absorption of dietary sterols is absolutely essential for the survival of *C. elegans*. [2,7–9]. In their natural environment, worms obtain sterols from exogenous sources such as bacterial membranes and animal and plant debris [1,10]. In laboratory conditions, cholesterol is added to the media to support normal growth and reproduction. Nematodes can survive with trace amounts of cholesterol, although effects like reduced offspring and stress resistance as well as growth defects are observed for several generations [11–14]. In complete cholesterol deprivation, more severe phenotypes are observed, including aberrant somatic gonad development, alterations in germ-cell proliferation as well as locomotion and molting defects [3,15,16]. If cholesterol deprivation is maintained, a general developmental arrest is observed at early larval stages with subsequent death [17].

Even though no specific tissues for fat storage have been identified in *C. elegans*, cholesterol staining with filipin or growing animals in the presence of fluorescent cholesterol analogs has revealed that some cells and structures are enriched in cholesterol, i.e. the pharynx, the excretory gland cell, the nerve ring, the intestine and phasmid socket cells in the tail. Oocytes are also rich in sterols, where cholesterol is essential to support embryonic development. [12,14,18]

Despite the vital importance of sterols in *C. elegans*, the precise molecular mechanisms responsible for cholesterol uptake and distribution are poorly understood. One protein proposed to be involved in cholesterol uptake in *C. elegans* is the LDL receptor-like protein-1 (LRP-1) [16]. Mutations in the *lrp-1* gene lead to phenotypes that share some aspects of cholesterol deprivation such as shedding inability and growth arrest, but have no effect on body size and fertility. Furthermore, *lrp-1* expression is restricted to the apical surface of the epithelium involved in body cuticle formation [19]. Due to its collagen-rich structure, it is unlikely that sterols passively cross the body cuticle to enter the worm. It seems that LRP-1 is involved in molting by promoting cuticle degradation through secretion or activation of proteases and collagenases, rather than sterol uptake [16,20].

In mammals, cholesterol uptake from the bloodstream is accomplished by the receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol particles. In *C. elegans*, a similar system is responsible for cholesterol uptake in oocytes, where RME-2, a member of the LDL receptor superfamily, mediates the endocytosis of vitellogenins (cholesterol-rich proteins) from the

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033962>

Nota: el símbolo oficial de “Cholesterol Uptake Protein-1” ha sido cambiado a “ChUP-1” en las bases de datos y posteriores publicaciones.

[ANEXOS]

Anexo I

CUP-1 no esta involucrado en la sistemicidad del RNAi en *C. elegans*.

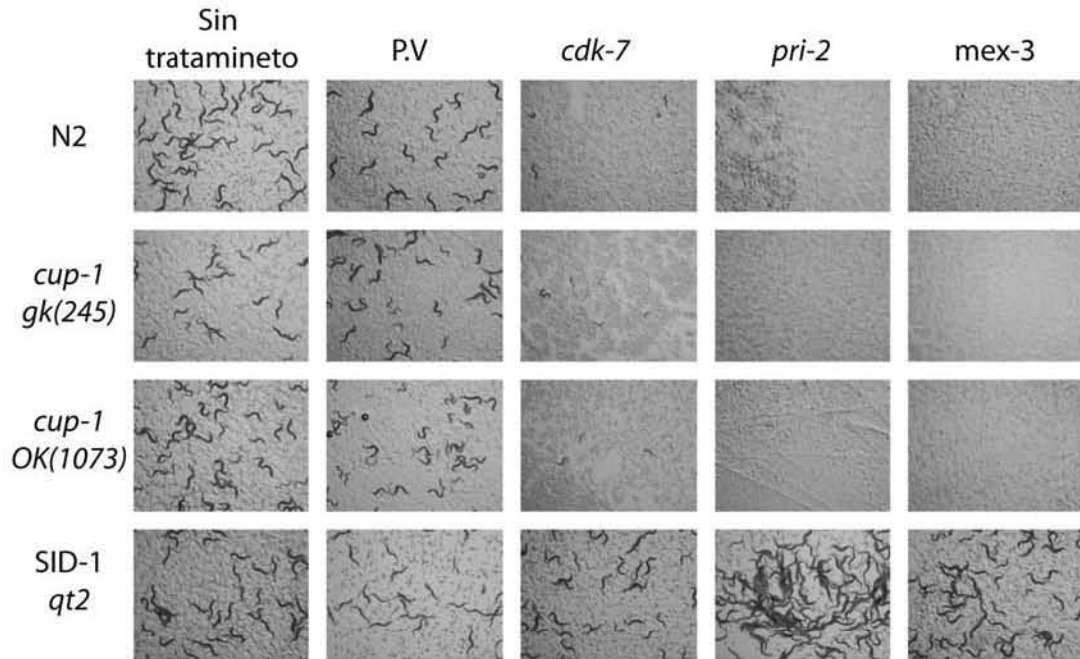
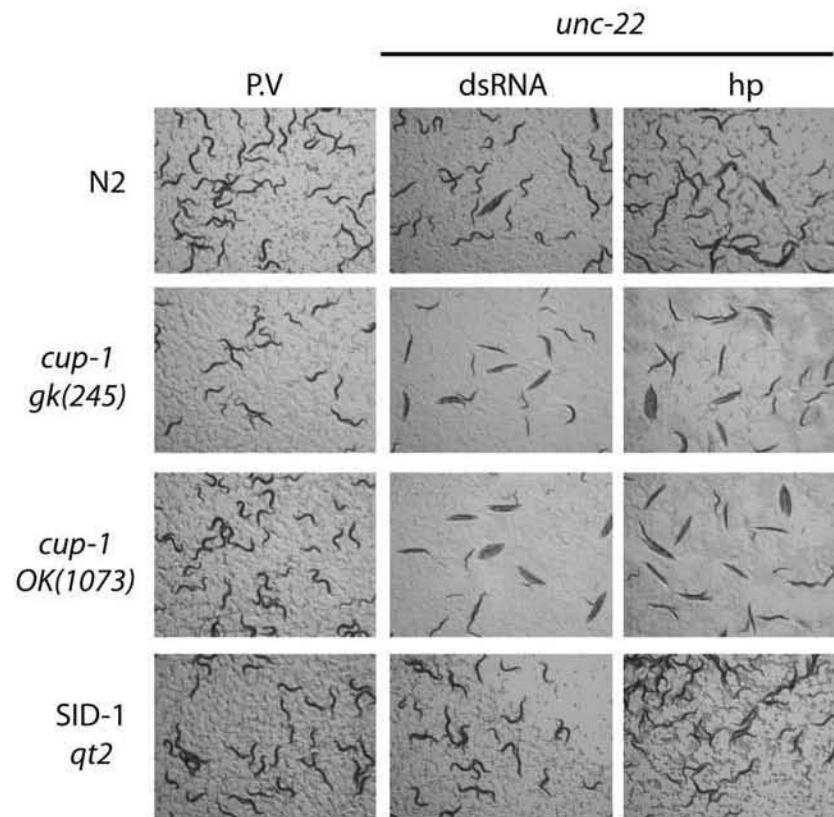
Aunque la identidad a nivel de aminoácidos entre CUP-1 y SID-1 esta por debajo del limite que pudiera suponer homología funcional, nos dimos a la tarea de descartar el involucramiento de CUP-1 en la vía del RNAi sistémico de manera experimental.

Para dicho fin se emplearon dos cepas mutantes de CUP-1: gk245 (delección en el promotor) y OK1073 (delección exones 14 a 17) las cuales fueron alimentadas con bacterias que expresan un dsRNA homólogo a los genes *cdk-7*, *pri-2* y *mex-3*. Cuando las bacterias son digeridas, el dsRNA pasa a las células intestinales y después es distribuido a todo el organismo hasta alcanzar las células somáticas y ovocitos donde produce letalidad embrionaria y por lo tanto esterilidad. En el panel **A** se muestra la progenie F1 de animales sometidos a este tipo de silenciamiento RNAi.

Como se puede observar, animales control o alimentados con bacterias que contienen un plásmido vacío (P.V) tienen una fertilidad normal, y a los 5 días se observa una gran cantidad de gusanos adultos (F1). Por el contrario, en los nemátodos alimentados con las bacterias RNAi no se observan animales lo que demuestra que el efecto sistémico del RNAi ocurrió. Como control negativo se empleo a la cepa carente de SID-1 *qt2* que es resistente al efecto sistémico del RNAi.

Adicionalmente se evaluó la capacidad de llevar a cabo un efecto RNAi de un gen somático, para esto se utilizo a *unc-22* cuyo RNAi provoca un fenotipo “twitching” (descoordinado) en los nemátodos. Si el efecto es muy severo incluso se puede observar parálisis. Para hacer el RNAi de *unc-22* se alimento a los nemátodos con bacterias que expresaban dsRNA homólogo a *unc-22* o solo un RNA pequeño tipo “tallo-asa”/“hairpin” (hp). Como puede observarse (**B**), los animales carentes de CUP-1 son sensibles al silenciamiento RNAi de este gen, y de hecho el fenotipo en estos animales parece ser más severo que en la cepa silvestre, probablemente sea el reflejo de los problemas en la movilidad observados ante la ausencia de CUP-1.

En conclusión, se puede observar la ausencia de CUP-1 no tiene ningún efecto negativo en el silenciamiento de genes somáticos o los expresados en la línea germinal.

A**B**

Adicionalmente, se reproduce la tabla publicada por Tomoyasu et. al. (2008) donde se cuantifica el fenotipo RNAi(*unc-22*) demostrando que las mutantes de *C. elegans* CUP-1 *gk245* o *ok1073* pueden llevar a cabo un efecto de RNAi sistémico.

Table 2

Feeding RNAi in *sid-1* and *tag-130* mutants

Genotype	Total number	<i>unc-22</i>	<i>non-unc</i>	% <i>unc</i> phenotype
N2 (wild type)	315	308	10	97.8%
<i>tag-130^{gk245}</i>	341	340	1	99.7%
<i>tag-130^{ok1073}</i>	140	138	2	98.6%
<i>sid1^{sq2}</i>	297	0	297	0.0%

Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M and Grossmann D, Bucher G.
Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. Genome Biol. 2008 Jan 17;9(1)

ANEXO II

Alineamiento múltiple de Secuencias por ClustalW 2.1

Servidor European Molecular Biology Laboratory <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2>

Predicción de segmentos transmembranales (TM) de ceCUP-1: TMHMM Server v. 2.0 (U. of Denmark). <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

Aminoácidos: Positivos, Negativos, Hidrofóbicos; Hidrofílicos

Motivo CRAC CONSERVADOS en *C. elegans* y mamíferos ([L/V-X₍₁₋₅₎-Y-X₍₁₋₅₎-R/K])

SEÑALES DE ENDOCITOSIS BASADAS EN LISINAS:

1.- Tyrosine-based sorting signals:

[YXXØ]: Ø = L, V, I, F, M. Localizado en segmentos intracelulares, a una distancia de entre 10 y 40 residuos del segmento transmembranal. No suelen ser funcional en el carboxilo terminal. Interacción con la subunidad μ 2 de AP-2; involucrado con la rápida internalización de proteínas en la membrana plasmática. También involucrado con direccionamiento a lisosomas y basolateral

2.- Dileucine-based signals fit:

[DE]XXXL[LI]: Interacción con las subunidades μ y β de los complejos AP; involucrado con internalización rápida de proteínas de membrana a endosomas y lisosomas además de direccionamiento basolateral. Puede estar cerca de segmentos TM.

[DXXLL]: Interacción con proteínas GGAs involucrados con el direccionamiento de endosomas en el trans-Golgi (TGN) y vías secretoras. Conservado en todos los metazoarios.

```
mSIDt2 -----
rSIDt2  MTSAGGRSPAVYRGAAPGGPEFCAASAALKGPASGKPTGQGHRLGSPGASGRVSSRAG 60
hSIDt2  -----
chSIDt2 -----
hSIDt1  -----
chSIDt1 -----
mSIDt1  -----
rSIDt1  -----
ceCUP-1 -----

mSIDt2 -----
rSIDt2  PGWGCGSRCRPREPGSARGPGAAPGRGVLSQAGVKVLPVRCWKLLRQPQRARSPSRRO 120
hSIDt2  -----
chSIDt2 -----
hSIDt1  -----
chSIDt1 -----
mSIDt1  -----
rSIDt1  -----
ceCUP-1 -----
```

mSIDt2 -----MIAWRLPLCVLLVASVESHGALGPKNVS-----QKDAEFERTYADDVNSE 46
rSIDt2 PPPPRAMIAWRLPLCVLLVAAVESHGALGPKNVS-----QKDAEFERTYADDVNSE 172
hSIDt2 -----MFALGLPFLVLLVASVESHGVLGPKNVS-----QKDAEFERTYVDEVNSE 46
chSIDt2 -----MFALGLPFLVLLVASVESHGVLGPKNVS-----QKDAEFERTYVDEVNSE 46
hSIDt1 -MRGCLRLALLCALPWLLLAASPGHPAKSPRQPAPRRDPFDAARGADFDHVYSGVVNLS 59
chSIDt1 -MRGCLRLALLCALPWLLLAASPGHTAKSPRQPAPRRDPFDAARGADFDHVYSGVVNLS 59
mSIDt1 -MLDCLRLALLCALPWLLRAAVPGHQEELAKSAELRRDPRDPARGADFDVYSGVVSL 59
rSIDt1 -----
ceCUP-1 -----MRTSQAFILIFLDSVRNQSPO-----VIPAKWDVVYKETGHN 39

mSIDt2 LVNIYTFNHTVTRNRTEGVRVSVNVLNKQKGAPLLFVVRQKEAVVSFQVPLILRGLYQRK 106
rSIDt2 LVNIYTFNHTVTRNRTEGVRVSVNVLNKQKGAPLLFVVRQKEAVVSFQVPLILRGLYQRK 232
hSIDt2 LVNIYTFNHTVTRNRTEGVRVSVNVLNKQKGAPLLFVVRQKEAVVSFQVPLILRGMFQRK 106
chSIDt2 LVNIYTFNHTVTRNRTEGVRVSVNVLNKQKGAPLLFVVRQKEAVVSFQVPLILRGMFQRK 106
hSIDt1 TENIYSFNYSQPDQVTAVRVVNSSSENLYPVLVVRQKEVLSWQVPLLFQGLYQRS 119
chSIDt1 TENIYSFNYSQPDQVTAVRVVNSSSENLYPVLVVRQKEVLSWQVPLLFQGLYQRS 119
mSIDt1 TENIYSFNHTSHPGQVTAVRVHVNSSSDNDYPVLVVRQKEVLSWQVPLLFQGLYQRS 119
rSIDt1 -----
ceCUP-1 MS--LTVFRFQVKEQYSVARIIMSCNESTEHNPLLAVFREKLAILSLQVPLIVD-----N 92

CRAC EXTRACELULAR

mSIDt2 YLYQKVERTLCQPPTKNESE--IQFFYVDVSTLSPVNTTYQLRVNRVDNFVLRGTGELFTF 164
rSIDt2 YLYQKVERTLCQPPTKNESE--IQFFYVDVSTLSPVNTTYQLRVNRVDNFVLRGTGELFTF 290
hSIDt2 YLYQKVERTLCQPPTKNESE--IQFFYVDVSTLSPVNTTYQLRVSRMDDFVLRGTGQFSF 164
chSIDt2 YLYQKVERTLCQPPTKNESE--IQFFYVDVSTLSPVNTTYQLRVSRMDDFVLRGTGQFSF 164
hSIDt1 YNYQEVSRRLCPSEATNETGPLEQLIFVDVASMALGAQYKLLVTKLKHFLQRTNVAHFH 179
chSIDt1 YNYQEVSRRLCPSEATNETGPLEQLIFVDVASMALGAQYKLLVTKLKHFLQRTNVAHFH 179
mSIDt1 YNYQEVSRRLCPSEATNETGPLEQLIFVDVASMALGAQYKLLVTKLKHFLQRTNVAHFH 179
rSIDt1 -----
ceCUP-1 YEYSQVARTLCPFTEYKEGE---AFTVEVTSSRPV--YNFRHAEVLQNFYLYNNSQRLV 146

mSIDt2 NTTAAQPQYFKYEFDPDGVDSVIVKVTSSKAFPCSVISIQDVLCPVYDLNNAVAFIGMYQT 224
rSIDt2 NTTAAQPQYFKYEFDPDGVDSVIVKVTSSKAFPCSVISIQDVLCPVYDLNNAVAFIGMYQT 350
hSIDt2 NTTAAQPQYFKYEFPEGVDSVIVKVTSSKAFPCSVISIQDVLCPVYDLNNAVAFIGMYQT 224
chSIDt2 NTTAAQPQYFKYEFPEGVDSVIVKVTSSKAFPCSVISIQDVLCPVYDLNNAVAFIGMYQT 224
hSIDt1 TASPSPQYFLYKFPKDVDSVIIVVSEMAYPCSVSVQNICPVYDLNNAVAFIGMYQS 239
chSIDt1 TASPSPQYFLYKFPKDVDSVIIVVSEMAYPCSVSVQNICPVYDLNNAVAFIGMYQS 239
mSIDt1 TASPSPQYFLYKFPEDVDSVIIVVSEKAYPCSVSVQNICPVYDLNNAVAFIGMYQS 239
rSIDt1 -----
ceCUP-1 TASASEPVYLRDIPGDVDSVAVHLSN-STICMTVSVQKIGCPVFDLDPNVNSMGLHQT 205

mSIDt2 MTKKAAITVQRKDFPSNSFYVVVVKTEDQACGGS LPFYPFVEDEPVDQGRQKTLSVLV 284
rSIDt2 MTKKAAITVQRKDFPSNSFYVVVVKTEDQACGGS LPFYPFVEDEPVDQGRQKTLSVLV 410
hSIDt2 MTKKAAITVQRKDFPSNSFYVVVVKTEDQACGGS LPFYPFVEDEPVDQGRQKTLSVLV 284
chSIDt2 MTKKAAITVQRKDFPSNSFYVVVVKTEDQACGGS LPFYPFVEDEPVDQGRQKTLSVLV 284
hSIDt1 MTKKAAITLQKDFPGEQFFVVFVIKPEDYACGG--SFFIQEKENQTNLQRKKNLEVTI 297
chSIDt1 MTKKAAITLQKDFPGEQFFVVFVIKPEDYACGG--SFFIQEKENQTNLQRKKNLEVTI 297
mSIDt1 MTKKAAITLQKDFPDEQFFVVFVIKPEDYACGG--SFSIQENENQTNLQRKKNLKVTI 297
rSIDt1 -----
ceCUP-1 MTTSATIPVEKSRMSS--FYVVFVNTNDDLCS EILSIKPN--KPTKFP LRMKSFNVTI 260

TM9

mSIDt2	WHFLSSIAMFGSFLVLLTLDDDL	DTVQRDKIYVF	832
rSIDt2	WHFLSSIAMFGSFLVLLTLDDDL	DTVQRDKIYVF	979
hSIDt2	WHFLSSIAMFGSFLVLLTLDDDL	DTVQRDKIYVF	832
chSIDt2	WHFLSSIAMFGSFLVLLTLDDDL	DTVQRDKIYVF	832
hSIDt1	WHFLSATALFFSFLVLLTLDDDL	DVVRDQIPVF	827
chSIDt1	WHFLSATALFFSFLVLLTLDDDL	DVVRDQIPVF	832
mSIDt1	WHFLSATALFFSFLVLLTLDDDL	DVVRDQIPVF	827
rSIDt1	WHFLSATALFFSFLVLLTLDDDL	DVVRDQIPVF	450
ceCUP-1	WHLSSAFAIFFSFTAINVI	DDDLMFVMRNTIRVF	756

** : * : * : * * * * . : . : * * * * * * * * * * * * *

m: Mus musculus
r: Rattus norvegicus
h: Homo sapiens
ch: Chimpanzee; Pan troglodytes
ce: Caenorhabditis elegans

†Las señales [YXXØ] en el segmento amino-extracelular fueron omitidas

RESUMEN

	SIDt1	SIDt2	CUP-1
YXXO*	3	3	1
DXXXLI*	1	2	
DXLL*		1	1
CRAC	1	2	2

* citoplásmicos

ANEXO III





















Expresión normalizada de SIDT1 y SIDT2 en tejidos humanos.

Datos: NCBI → UniGene → EST Profile [Marzo 2012]









































TPM: transcritos por millón

EST: "Expression sequence tags"

 = Representación grafica virtual basada en los TMP

TEJIDO	hSIDt1 [Hs.591291]		hSIDt2 [Hs.712144]	
	TPM	EST/Total	TPM	EST/Total
Tejido adiposo	0	0 / 13106	0	0 / 13106
Glándula adrenal	0	0 / 33197	60	 2 / 33197
Ascitis	0	0 / 40015	0	0 / 40015
Vejiga	33	 1 / 29757	0	0 / 29757
Sangre	16	 2 / 123478	113	 14 / 123478
Hueso	0	0 / 71655	69	 5 / 71655
Médula ósea	20	 1 / 48801	0	0 / 48801
Cerebro	34	 38 / 1100989	67	 74 / 1100989
Cérvix	0	0 / 48171	83	 4 / 48171
Tejido conectivo	0	0 / 149255	60	 9 / 149255
Oído	0	0 / 16212	0	0 / 16212
Tejido Embrionario	0	0 / 215722	32	 7 / 215722
Esófago	0	0 / 20209	0	0 / 20209
Ojo	0	0 / 211054	80	 17 / 211054
Corazón	0	0 / 89626	33	 3 / 89626
Intestino	17	 4 / 234472	76	 18 / 234472
Riñón	0	0 / 211777	33	 7 / 211777
Laringe	0	0 / 24145	82	 2 / 24145
Hígado	0	0 / 207743	28	 6 / 207743
Pulmón	5	 2 / 336974	53	 18 / 336974

Continuación tejidos...

Ganglio	0	0 / 44270	0	0 / 44270
Nódulo linfático	32	 3 / 91610	54	 5 / 91610
Glándula mamaria	32	 5 / 153271	123	 19 / 153271
Boca	14	 1 / 67052	89	 6 / 67052
Músculo	9	 1 / 107715	9	 1 / 107715
Nervio	0	0 / 15768	253	 4 / 15768
Ovario	0	0 / 102051	39	 4 / 102051
Páncreas	4	 1 / 214812	69	 15 / 214812
Paratiroides	0	0 / 20539	48	 1 / 20539
Faringe	0	0 / 41328	72	 3 / 41328
Glándula pituitaria	0	0 / 16585	0	0 / 16585
Placenta	0	0 / 280825	124	 35 / 280825
Próstata	31	 6 / 189345	47	 9 / 189345
Glándula salival	0	0 / 20155	0	0 / 20155
Piel	0	0 / 210574	4	 1 / 210574
Bazo	55	 3 / 53952	55	 3 / 53952
Estómago	51	 5 / 96619	31	 3 / 96619
Testículos	0	0 / 330442	157	 52 / 330442
Timo	86	 7 / 81131	49	 4 / 81131
Toroide	0	0 / 47473	147	 7 / 47473
Angina	0	0 / 16999	0	0 / 16999
Tráquea	57	 3 / 52413	95	 5 / 52413
Cordón umbilical	0	0 / 13680	0	0 / 13680
		hSIDt1 [f  91]		hSIDt2 [Hs. ]
Patologías	TPM	EST/Total	TPM	EST/Total
T. adrenal	0	0 / 12794	0	0 / 12794
Carcinoma de vejiga	0	0 / 17475	0	0 / 17475
T. de mama	42	 4 / 94178	63	 6 / 94178
T. cervical	0	0 / 34366	116	 4 / 34366
Condrosarcoma	0	0 / 82823	36	 3 / 82823
Tumor colorectal	17	 2 / 114246	96	 11 / 114246
T. esofagal	0	0 / 17290	0	0 / 17290
T. Gastrointestinal	33	 4 / 119369	25	 3 / 119369
T de cel. germinales	0	0 / 263845	34	 9 / 263845
Glioma	0	0 / 106883	18	 2 / 106883

Continuación patologías...

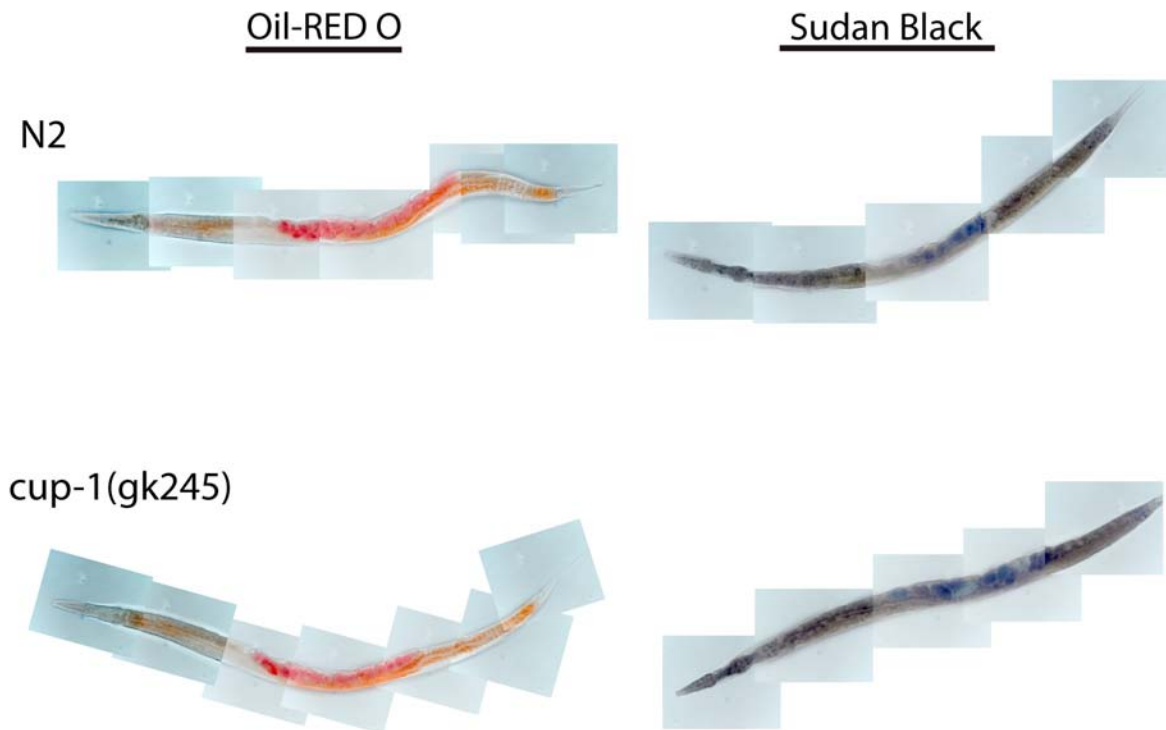
T. de cabeza y cuello	7		1 / 136302	88		12 / 136302
T. de Riñón	0		0 / 68959	43		3 / 68959
Leucemia	10		1 / 95842	156		15 / 95842
T. Hepático	0		0 / 96359	62		6 / 96359
T. Pulmonar	0		0 / 103127	9		1 / 103127
Linfoma	0		0 / 71755	41		3 / 71755
Pre-neoplasia	10		1 / 97250	123		12 / 97250
Normal Pull	16		56 / 3360307	69		234 / 3360307
T. Ovario	0		0 / 76682	52		4 / 76682
T. Pancreático	0		0 / 104616	86		9 / 104616
T. neuroectodermal primitivo	0		0 / 125680	15		2 / 125680
Cáncer prostático	29		3 / 102680	19		2 / 102680
Retinoblastoma	0		0 / 46356	43		2 / 46356
T. de piel	0		0 / 124949	0		T: tumor 0 / 124949
T. Tejido/músculo blando	0		0 / 125191	7		1 / 125191
T. uterino	33		3 / 90257	33		3 / 90257

	hSIDt1 [Hs.591291]		hSIDt2 [Hs.712144]		
DESARROLLO	TPM	EST/Total	TPM	EST/Total	
Cuerpo embrionario	0	0 / 70761	14		1 / 70761
Blastocito	0	0 / 62319	32		2 / 62319
Feto	7		53		30 / 564012
Neonato	0	0 / 31097	0		0 / 31097
Infante	0	0 / 23620	0		0 / 23620
Joven	0	0 / 55556	125		7 / 55556
Adulto	10		94		184 / 1939121

ANEXO IV

Tinción de lípidos

La tinción inespecífica de lípidos con los colorantes Oil Red O y Sudan Black de gusanos adultos no reveló diferencias significativas en la distribución o acumulación de lípidos en la cepa *cup-1(gk245)* en comparación con la cepa silvestre N2.

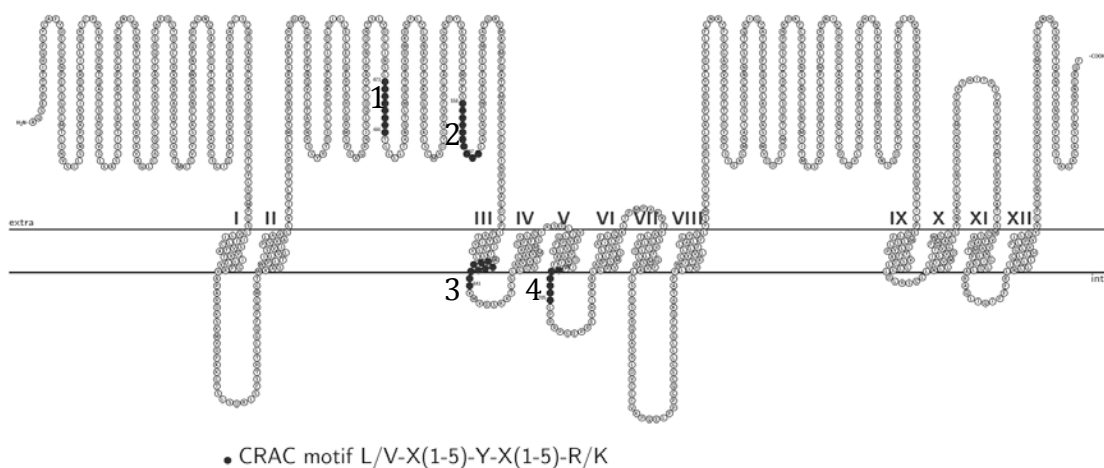


Los lípidos son detectados principalmente en el aparato digestivo de los gusanos y en los embriones de estos. Oil-Red-O: tinción toda la noche, aumento 60X. Sudan Black: tinción 4 horas, aumento 40X. Cabeza a la izquierda; cola a la derecha.

Anexo V

Motivos CRAC en la proteína NPC1L1 humana.

Lumen intestinal



	Motivo CRAC	Aminoácidos
1	Extracelular 1	473-480
2	Extracelular 2	558 - 567
3	Transmembranal (3er cruce)	633 - 641
4	Transmembranal (5to cruce)	700-705