

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MLN64 EN EL CONTENIDO DE COLESTEROL, LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARIA JOSE PINOCHET BAIER

PROFESOR GUÍA: DRA. SILVANA ZANLUNGO MATSUHIRO

TEMUCO – CHILE

2013

“EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MLN64 EN EL CONTENIDO DE COLESTEROL, LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS”.

PROFESOR GUIA

: \_\_\_\_\_

Dra. Silvana Zanlungo Matsuhira  
Investigadora del Departamento de  
Gastroenterología UC  
Pontificia Universidad de Chile

PROFESORES CONSEJEROS

: \_\_\_\_\_

Dr. Favián Treulen Seguel  
Departamento de Medicina Interna  
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar manifestando mis agradecimientos a todas las personas que contribuyeron al desarrollo de este trabajo, gracias a su apoyo, ánimo y motivación es que he podido completarlo.

En especial quisiera agradecer a la Doctora Silvana Zanlungo, quien fue mi tutora en este proceso, la que me recibió en su laboratorio y se preocupó de mi desarrollo como profesional. Sin su gran apoyo, constante preocupación y habilidad para enseñar, no hubiera logrado crecer como persona, compañero, profesional, etc. Todo lo que soy se lo debo en gran medida a ella, al darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de laboratorio y contribuir a este. Aquí aprendí a compartir, interactuar y relacionarme con más gente, en especial con Elisa Balboa, Lila González, Tamara Marin, Mariana Acuña, María José Pérez, María José Yañez, Fernanda Tapia, Pablo Martínez, Juan Castro y Juan Esteban Oyarzun, todos ellos contribuyeron en mi crecimiento personal y profesional, y siempre les estaré agradecida por su compañía, dedicación y especialmente por haberme hecho sentir bienvenida en el laboratorio.

En particular quisiera agradecer a Elisa Balboa, quien me enseñó todo lo que se, especialmente a manejarme en un laboratorio. Gracias a su gran habilidad para enseñar, su forma de repetir las cosas de manera didáctica y entretenida, su buena disposición para explicar y su inagotable paciencia, pude llevar a cabo este trabajo de manera agradable y tranquila. Sin su constante apoyo estoy segura que este trabajo no sería lo que es. Por lo que le vuelvo a manifestar mis agradecimientos y le deseo mucho éxito en cualquier proyecto que se proponga.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia, quienes a lo largo de los años me han visto desarrollarme como persona, contribuyendo paso a paso a este proceso y sin los cuales yo no podría haber llegado hasta esta etapa en la vida. Quisiera agradecer especialmente a mi madre Mitzi Baier, que fue un gran pilar en mi formación, velando por mi desarrollo y bienestar. También quisiera agradecer a mis hermanas Constanza y Francesca Pinochet, quienes me dieron la fortaleza para seguir adelante. Tampoco puedo olvidar el gran apoyo que me brindaron mis abuelos y mi tío Marcelo Baier, quienes me ayudaron en todo momento y que siempre velaron por mí y me dieron palabras de aliento.

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	12
2.1.	Importancia del colesterol dentro de la célula	12
2.2.	Transporte y regulación del colesterol	12
2.3.	Proteínas Transportadoras de colesterol	15
2.4.	MLN64: Un miembro de la familia START	16
2.5.	El colesterol y su papel en la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo.	18
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	21
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	21
4.1	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	21
4.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	21
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
5.1.	Cultivo celular	22
5.2.	Infección con adenovirus recombinante	22
5.3.	Purificación de mitocondrias y medición del contenido de colesterol mitocondrial	22
5.3.1	Western blot contra Catepsina B, Cox IV, $\epsilon$ -cop y MLN64	23
5.3.2	Medición del contenido de colesterol mitocondrial mediante el Kit Amplex Red	23
5.4	Inmunofluorescencia contra Cox-IV, Lamp1, MLN64 y Filipina.	24
5.5	Determinación de la función mitocondrial	25
5.6	Determinación del estrés oxidativo	26
5.6.1	Medición del contenido de GSH total, mitocondrial y citosólico	26
5.6.2	Determinación de la producción de estrés oxidativo mitocondrial mediante MitoSOX.	27
5.6.3	Western blot contra HNE	27
5.6.4	Extracción y cuantificación del ARN	27
5.6.5	Tratamiento con DNAsas y Preparación de cDNA	28

5.6.6	Cuantificación genes marcadores de estrés oxidativo	28
5.6.7	Inmunofluorescencia contra nitrotirosina	29
5.8	Análisis estadístico	29
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b>	31
6.1	Efecto de la infección con un adenovirus recombinante de MLN64 sobre los niveles y la localización subcelular de MLN64 en células Hepa1-6	30
6.2	Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol mitocondrial en células Hepa1-6	33
6.3	Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la función mitocondrial en células Hepa1-6.	35
6.4	Efecto de la sobreexpresión de la proteína MLN64 sobre el estrés oxidativo en células Hepa1-6	38
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	43
7.1	Localización subcelular de MLN64 en células Hepa1-6	43
7.2	MLN64 y su papel en la homeostasis del colesterol	44
7.3	MLN64 y disfunción mitocondrial	45
7.4	MLN64 y estrés oxidativo	46
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	49
<b>IX.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Vía endógena de la biosíntesis de colesterol.
- Figura 2 Vía exógena de la captación de colesterol.
- Figura 3 Representación esquemática de las proteínas MENTHO, MLN64 y StAR.
- Figura 4 Modelo de la posible función de MLN64 en el transporte intracelular de colesterol.
- Figura 5 Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y la relación substrato/inhibidor
- Figura 6. Esquema de la cadena de respiración mitocondrial y el efecto de sus sustratos/Inhibidores analizada mediante el equipo Oxygraph en células Hepa1-6.
- Figura 7 Efecto de la infección con el Ad.MLN64 sobre los niveles de ARN mensajero y la proteína MLN64 en la línea celular Hepa1-6.
- Figura 8 Colocalización de MLN64 con marcadores mitocondriales y lisosomales.
- Figura 9 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol en células Hepa1-6.
- Figura 10 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el potencial de membrana en células Hepa1-6.
- Figura 11 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el Consumo de O<sub>2</sub> en células Hepa1-6.
- Figura 12 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de glutatión reducido mitocondrial (mGSH).
- Figura 13 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la producción de superóxido mitocondrial.
- Figura 14 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de 4-hidroxinonal (HNE).
- Figura 15 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la expresión de genes marcadores de estrés oxidativo en células Hepa 1-6.
- Figura 16 Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de nitrotirosina (Ntyr) en células Hep1-6.

## RESUMEN

MLN64 (*human metastatic lymph node 64*) es una proteína de membrana localizada en organelos endocíticos como subpoblaciones de endosomas tardíos que une colesterol y cuya función no ha sido completamente dilucidada aún.

La sobreexpresión de MLN64 en células esteroideogénicas aumenta la esteroideogénesis al estimular la movilización de colesterol endosomal/lisosomal hacia la membrana mitocondrial. El papel de MLN64 en la mantención del flujo de colesterol endosomal y la homeostasis intracelular del colesterol en el hígado no se conoce. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la sobreexpresión hepática de MLN64 en ratones incrementa el contenido de colesterol libre e induce la disminución de GSH total. Nuestro objetivo principal fue evaluar si la sobreexpresión de MLN64 produce un aumento del contenido de colesterol mitocondrial y contribuye al daño oxidativo y la disfunción mitocondrial en un modelo de hepatocitos en cultivo.

Metodología: se utilizó un adenovirus recombinante que contenía la región codificante para la proteína MLN64 para sobreexpresar MLN64 en células Hepa1-6. Se midió el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre: i) el colesterol mitocondrial usando el Kit Amplex Red Cholesterol Assay, ii) los niveles de glutatión reducido (GSH), iii) el potencial de membrana usando Mitotracker Red, iv) el estrés oxidativo midiendo los niveles de 4-hidroxinonenal (HNE) y de nitrotirosina (Ntyr) y la expresión de genes mediante PCR en tiempo real.

Resultados: las células Hepa1-6 con sobreexpresión de MLN64 mostraron un aumento en el contenido de colesterol libre, una disminución del potencial de membrana mitocondrial, elevados niveles de nitrotirosina y alteraciones de marcadores de estrés oxidativo como niveles de glutatión reducido, HNE y de transcritos de genes de estrés oxidativo.

Conclusiones: nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de MLN64 en hepatocitos induce un aumento en el transporte de colesterol hacia la mitocondria y en consecuencia una disminución en el contenido mitocondrial de GSH y del potencial de membrana, induciendo disfunción mitocondrial.

## SUMMARY

MLN64 (*human metastatic lymph node 64*) is a membrane protein localized in endocytic organelles of the late endosomes subpopulation which binds cholesterol and whose function has not been fully elucidated.

Overexpression of MLN64 in steroidogenic cells enhanced steroidogenesis apparently by stimulating the mobilization of late endosomal/lysosomal cholesterol to the mitochondrial membrane. The role of MLN64 in the maintenance of endosomal cholesterol flow and intracellular cholesterol homeostasis in the liver remains unclear.

Hepatic overexpression of MLN64 in mice increased cholesterol content and induced depletion of total GSH. Our aim was to evaluate whether MLN64 overexpression produces an increase in the mitochondrial cholesterol content and contributes to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in an *in vitro* hepatocyte model.

Methods: Recombinant-adenovirus-mediated MLN64 gene transfer was used to overexpress MLN64 in Hepa 1-6 cells. We measured the effects of MLN64 overexpression on: i) mitochondrial cholesterol using the Amplex Red Cholesterol Assay Kit, ii) reduced glutathione (GSH) levels, iii) mitochondrial membrane potential using Mitotracker Red, iv) the superoxide production was evaluated using MitoSOX, v) oxidative stress, measuring the levels of 4-hydroxynonenal (HNE) and nitrotyrosine (Ntyr) and the expression of oxidative stress genes with quantitative PCR.

Results: In MLN64 overexpressing hepa1-6 cells we found an increase in free cholesterol levels, decreased mitochondrial membrane potential, elevated levels of nitrotyrosine and alterations in markers of oxidative stress as reduced glutathione, HNE and transcript levels of oxidative stress genes.

Conclusions: Our findings suggest that MLN64 overexpression in hepatic cells induces an increase in cholesterol transport to mitochondria and consequently a decrease in mitochondrial GSH content and mitochondrial membrane potential that leads to mitochondrial dysfunction.



## I. INTRODUCCIÓN

El colesterol es una molécula biológica esencial que desempeña diversos papeles en el organismo. El colesterol está presente en todas las membranas de los organelos intracelulares de animales, como el retículo endoplasmático, los lisosomas, las mitocondrias, etc. (Lange and Steck, 1997, Lange et al., 1997, Garcia-Ruiz et al., 2009). En las células animales se han desarrollado complejos y sofisticados mecanismos para mantener los niveles de colesterol celular dentro de un rango normal, como el sistema molecular basado en las proteínas SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) (Briggs et al., 1993, Wang et al., 1993, Espenshade, 2006, Xiaoping and Fajun, 2012).

Cuando se produce un desbalance en los mecanismos homeostáticos del colesterol las consecuencias pueden llegar a ser devastadoras a nivel celular y sistémico (Maxfield and Tabas, 2005). Se ha visto que en ciertas patologías como la enfermedad de Alzheimer (Bobba et al., 2010), la enfermedad de Niemann Pick Tipo C (Vazquez et al., 2012a, Vazquez et al., 2012b) y el hígado graso (Nakamuta et al., 2009) se genera un desbalance en la homeostasis del colesterol, produciéndose una acumulación de éste en organelos de la célula como los lisosomas y las mitocondrias (Sobo et al., 2007, Violante et al., 2012), lo que se ha asociado a disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y muerte celular (Violante et al., 2012, Tabas, 2002). En estas patologías se ha observado que los tejidos más afectados son el cerebro y el hígado, sin embargo, el mecanismo por el cual se produce muerte celular en estos tejidos aún no ha sido completamente dilucidado. Una posible causa de la muerte celular puede deberse a un transporte defectuoso del colesterol a través de los organelos de la célula (Ikonen, 2006, Ma et al., 2008, Wood et al., 1999, Puglielli et al., 2003). En acuerdo con esta teoría se ha reportado que el aumento de colesterol mitocondrial está asociado a disfunción mitocondrial y aumento del estrés oxidativo (Bosch et al., 2011). Además se ha visto que un aumento del contenido de colesterol mitocondrial produce pérdida de la fluidez de la membrana mitocondrial y un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis (Mari et al., 2009). Esto genera una disminución de la síntesis de ATP y de la entrada del glutatión (GSH) hacia la mitocondria, provocando una alteración en la eficiencia de la cadena respiratoria y de la defensa antioxidante (Mari et al., 2009), lo que finalmente lleva a muerte celular.

Dada la gran importancia de mantener niveles adecuados de colesterol celular, su tráfico intracelular está controlado de manera robusta por diversas moléculas, entre ellas receptores de la superficie celular como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y el receptor scavenger de clase B tipo I (SRBI) (Bloks et al., 2004, Dube et al., 2013, Rigotti et al., 2003), factores de transcripción pertenecientes a la familia SREBP, los que en general regulan la concentración de colesterol en la célula (Xiaoping and Fajun, 2012, Horton et al., 2002), las proteínas pertenecientes a la familia START, capaces de unir colesterol como la proteína STARD3 (Soccio and Breslow, 2003) o esteroides como los oxisteroides, que están involucrados en la homeostasis del colesterol (Schroepfer, 2000, Lehto and Olkkonen, 2003).

De especial interés para esta tesis es la proteína STARD3 ó MLN64 (metastatic lymph node protein 64). Esta es una proteína integral de membrana localizada principalmente en subpoblaciones de endosomas tardíos (van der Kant et al., 2013), compuesta por dos dominios distintos. El dominio amino terminal contiene cuatro hélices transmembrana y se denomina MENTAL (MLN64 N-Terminal) y el dominio carboxilo terminal se denomina START (steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid-transfer) (Soccio and Breslow, 2003). El dominio MENTAL es capaz de unir colesterol y el dominio START es un dominio de unión de lípidos que también está presente en la proteína StAR (Steroidogenic acute regulatory protein), la cual es capaz de transportar colesterol desde fuentes intracelulares hacia la mitocondria de tejidos esteroideogénicos estimulando la síntesis de hormonas esteroideas (Stocco and Clark, 1996).

La función de la proteína MLN64 en el tráfico intracelular de colesterol no ha sido completamente dilucidada (Ha et al., 2012a). Sin embargo, su topología sugiere que MLN64 es un componente importante en la maquinaria de transporte de colesterol desde los endosomas tardíos y lisosomas hacia el resto de la célula (Alpy et al., 2001, Strauss et al., 2002).

Interesantemente, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión hepática de MLN64 en un modelo *in vivo* induce daño hepático, aumento de la apoptosis y aumento del contenido de colesterol hepático libre (Tichauer et al., 2007). Otros estudios reportaron que una mutante de MLN64 que carece del dominio START induce acumulación de colesterol en lisosomas (Zhang et al., 2002), mientras que otro grupo de investigadores demostraron que la reducción de la expresión de MLN64 mediante ARN de

interferencia disminuye el transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial en células CHO deficientes en la proteína lisosomal NPC1 (Charman et al., 2010). Todos estos antecedentes permiten proponer un papel de MLN64 en la mantención del flujo de colesterol endosomal, en la homeostasis del colesterol intracelular y en el transporte de colesterol desde la vía endosomal hacia la mitocondria (Zhang et al., 2002, Alpy et al., 2002, Rigotti et al., 2010) .

Por los antecedentes anteriormente mencionados, planteamos como hipótesis de trabajo que la sobreexpresión de MLN64 aumenta el transporte de colesterol hacia la mitocondria, lo que produciría una disfunción mitocondrial, aumentando el estrés oxidativo y en consecuencia promovería la muerte celular. El objetivo principal de esta investigación es evaluar si la sobreexpresión de MLN64 en hepatocitos produce un aumento del contenido de colesterol mitocondrial y si esto contribuye al daño oxidativo y a la disfunción mitocondrial.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importancia del colesterol celular

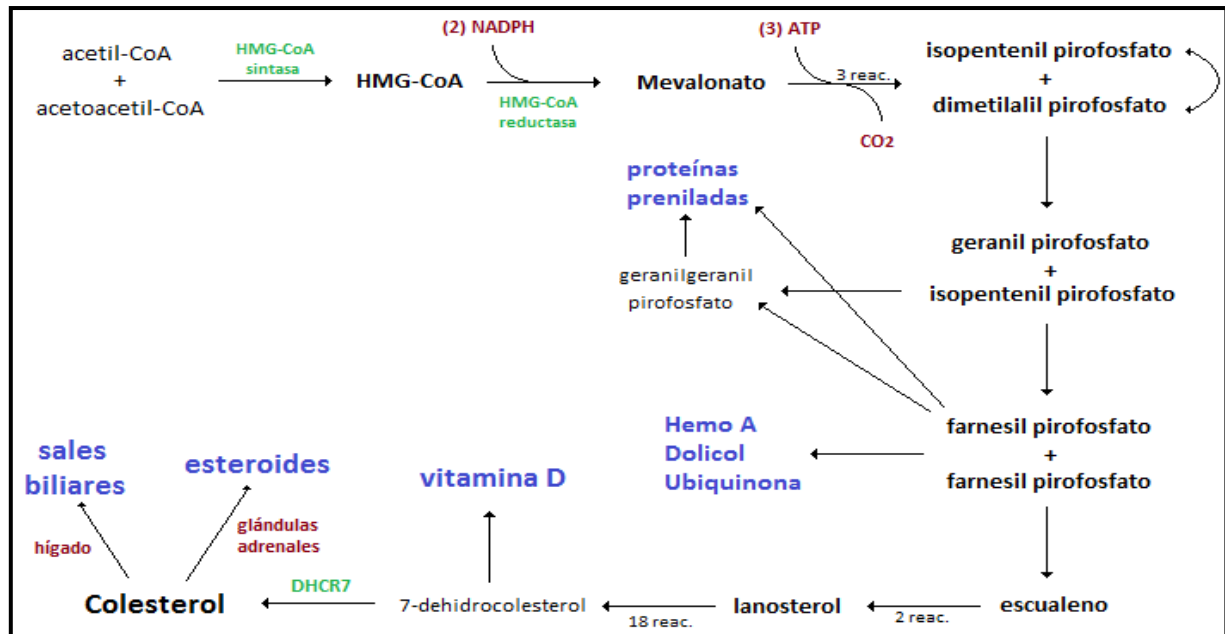
El colesterol es una molécula biológica esencial que desempeña diversas funciones en el organismo. Es el componente estructural de todas las membranas celulares y a su vez es el precursor de las hormonas esteroidales, la vitamina D y de los ácidos biliares involucrados en la digestión. El colesterol modula la estabilidad, permeabilidad y movilidad de las proteínas en la membrana, facilita la señalización celular y además también está presente en todas las membranas animales de los organelos intracelulares como en las mitocondrias y el retículo endoplasmático (Maxfield and Tabas, 2005). En las células animales se han desarrollado complejos y sofisticados mecanismos para mantener los niveles de colesterol celular dentro de un rango normal. Cuando se produce un desbalance en los mecanismos homeostáticos, las consecuencias pueden llegar a ser devastadoras a nivel celular y sistémico (Maxfield and Tabas, 2005). Un ejemplo de este desbalance de colesterol ocurre en patologías como la enfermedad de Niemann Pick tipo C, donde el colesterol se acumula en los lisosomas, particularmente en las células de órganos importantes como el hígado y cerebelo, induciendo daño y muerte celular en los tejidos (Vazquez et al., 2011, Erickson, 2013, Patterson et al., 2012).

### 2.2 Transporte y regulación del colesterol celular

Las células animales obtienen el colesterol a través de dos vías: por la síntesis *de novo* en el retículo endoplásmico a partir de su precursor el acetil-coenzimaA; y a través de la absorción del colesterol preexistente en los alimentos de origen animal, denominada vía exógena.

En la vía endógena, el colesterol celular se sintetiza *de novo* en el retículo endoplásmico (ER). Cuando hay un exceso de colesterol éste se almacena como ésteres de colesterol en el citoplasma. Este proceso está catalizado por la acil-coenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT).

La síntesis de *novo* es regulada controlando la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCR), enzima que cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato, etapa limitante de la biosíntesis de colesterol (Ikonen, 2008) (Figura 1).



**Figura 1. Vía endógena de la biosíntesis de colesterol.**

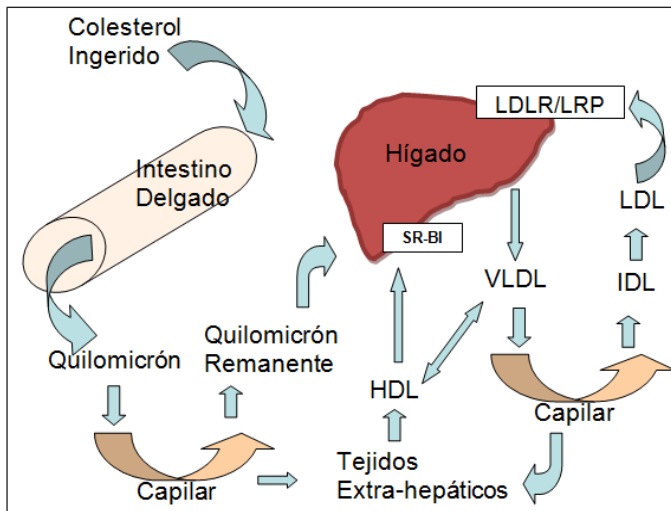
La síntesis de colesterol comienza con el transporte del acetil-CoA desde la mitocondria al citoplasma, donde el acetil-CoA se convierte en 3 hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El paso limitante ocurre en la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa (HMGR), que posteriormente se convierte en mevalonato. El mevalonato se convierte en isopentenil pirofosfato (IPP), con la pérdida de  $\text{CO}_2$ . Las reacciones de la fosforilación son necesarias para solubilizar los intermedios isoprenoides de la vía, los cuales son usados para la síntesis de proteínas preniladas, del dolicol, de la coenzima Q y de la cadena lateral del hemo A. El IPP se convierte en escualeno, para posteriormente convertirse en colesterol. En la figura se indican también los compuestos derivados del 7-dehidrocolesterol y del colesterol, como vitamina D, esteroides y sales biliares.

En la vía exógena, el colesterol dietario es absorbido por los enterocitos en el intestino delgado, donde es empaquetado, junto con los triglicéridos y la apolipoproteína B (APOB) en quilomicrones. La apolipoproteína E (APOE) genera remanentes de quilomicrones, que son captados por los hepatocitos, los que posteriormente secretan los lípidos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que son procesadas en la circulación y pasan a ser lipoproteínas de baja densidad (LDL), la principal lipoproteína que entrega colesterol a los tejidos

periféricos. El colesterol que no es captado en los tejidos periféricos vuelve al hígado para su utilización o conversión a sales biliares (Ikonen, 2008).

El hepatocito capta colesterol de lipoproteínas como LDL, VLDL y los remanentes de quilomicrones por receptores endocíticos (Ishibashi, 1994, Rohlmann et al., 1998, Dietschy et al., 1993b, Dietschy et al., 1993a). Las HDL devuelven los lípidos al hígado en un proceso llamado transporte reverso de colesterol (Ikonen, 2008).

A nivel hepático el receptor involucrado en la captación del colesterol desde HDL es el Receptor Scavenger clase B tipo I (SRBI), que capta el colesterol por un mecanismo denominado captación selectiva de colesterol, ya que la HDL es capaz de entregar selectivamente su contenido de colesterol al hígado sin endocitosis ni degradación de la partícula lipoproteica (Leiva et al., 2011, Rigotti et al., 1997) (Figura 2).



**Figura 2. Vía exógena de la captación de colesterol.**

El colesterol y triglicéridos de la dieta son absorbidos en el intestino delgado y empaquetados en quilomicrones ricos en triglicéridos. Los quilomicrones son secretados hacia la sangre y tejidos. Los remanentes de quilomicrón son captados por el hígado y reensamblados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para ser secretados a la circulación donde las VLDL son transformadas en remanentes de VLDL. Luego de entregar los lípidos en los distintos tejidos, la mayor parte de los remanentes de VLDL son captadas por el hígado ó sufren mayor lipólisis, convirtiéndose en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) o de baja densidad (LDL). Una gran proporción de las IDL y LDL son captadas por el hígado y parte importante de las LDL son captadas por tejido extrahepático. El colesterol puede ser transportado desde los tejidos periféricos hacia el hígado a través de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las HDL pueden esterificar el colesterol libre y transferir el colesterol éster hacia lipoproteínas VLDL o IDL.

### 2.3 Proteínas transportadoras de colesterol

La movilización de colesterol celular a la membrana plasmática y el flujo hacia aceptores extracelulares es un importante mecanismo para regular los niveles de colesterol celular.

El tráfico intracelular del colesterol está controlado por diversas moléculas, entre ellas encontramos: los receptores de lipoproteínas, como el LDLR y SRBI (Blok et al., 2004, Dube et al., 2013, Rigotti et al., 2003); los factores de transcripción pertenecientes a la familia SREBP, los que en general regulan la concentración de colesterol en la célula (Xiaoping and Fajun, 2012, Horton et al., 2002) y los esteroides como los Oxysteroides, que están involucrados en la homeostasis del colesterol (Schroepfer, 2000, Lehto and Olkkonen, 2003). También participan las proteínas SCP-2 y las caveolinas (Fernandez-Rojo et al., 2012, Alpy and Tomasetto, 2005, Ren et al., 2004). Además existen dos familias de proteínas principales para el transporte de lípidos que son específicas para el transporte de esteroides: la familia con dominio START de sus siglas en inglés (steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid-transfer (START) domain) y la familia de unión a oxisteroides (OSBP,) la que incluye las proteínas relacionadas a OSBP (ORPs) (Clark, 2012).

La familia de proteínas con el dominio START está bien caracterizada y está compuesta por 15 miembros, denominadas STARD1 a STARD15, que están agrupadas en seis subfamilias basadas en las similitudes de sus secuencias y del ligando que unen (Ponting and Aravind, 1999, Socio et al., 2002). Algunos de los miembros de esta familia son capaces de unir lípidos, como colesterol, oxisteroides, fosfolípidos o esfingolípidos en el dominio START y participan en el transporte intracelular de éstos, en su metabolismo y en eventos de señalización celular (Alpy et al., 2009). De nuestro particular interés es la subfamilia de proteínas que unen colesterol (STARD1/D3). Dentro de esta familia se encuentran las proteínas STARD1/StAR y STARD3/MLN64.

La proteína STARD1 o StAR es la proteína fundadora de la familia y se expresa en su mayoría en las glándulas adrenales y en las gónadas (Stocco and Clark, 1996, Clark et al., 1994). La proteína StAR es la única de la familia que contiene una secuencia señal N-terminal que dirige la proteína hacia la membrana mitocondrial externa. Esta proteína une colesterol en su dominio C-terminal START y facilita la traslación de colesterol dentro de la matriz mitocondrial hacia las

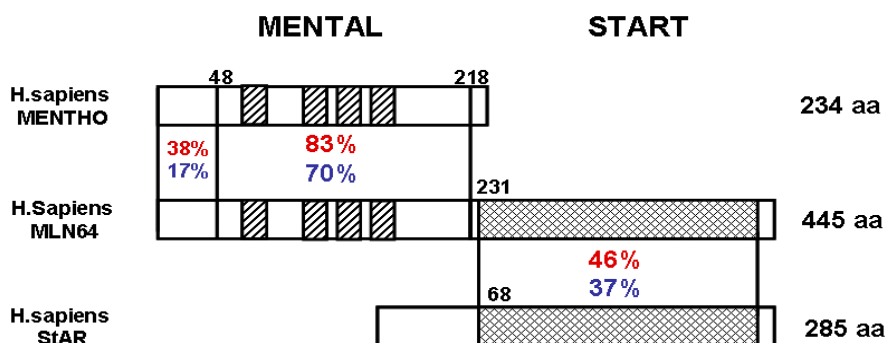
enzimas P450<sub>scc</sub> o CYP27A1 para la síntesis de hormonas esteroidales o oxisteroles, respectivamente (Clark, 2012).

#### 2.4 MLN64: Un miembro de la familia START

La proteína STARD3 o MLN64 (human metastatic lymph node 64), fue identificada por hibridación diferencial desde una librería de cDNA en nódulos linfáticos metastásicos derivados de cáncer mamario (Moog-Lutz et al., 1997) (Tomasetto et al., 1995a).

El cDNA de MLN64 codifica para una proteína de 445 aminoácidos que en su dominio amino terminal posee 4 segmentos de transmembrana que tienen una identidad del 70% y una similitud del 83% con la proteína del endosoma tardío MENTHO (MLN64 N-Terminal domain Homologue), dominio que se ha designado como MENTAL (MLN64 N-Terminal). MLN64 posee en su extremo carboxilo terminal un dominio START con 37% de identidad y 47% de similitud con la proteína StAR (Alpy et al., 2002, Moog-Lutz et al., 1997), orientado hacia el citoplasma (Figura 3).

La proteína MLN64 une colesterol al igual que StAR y además, al igual que StAR contiene un péptido señal de destinación en la región N-Terminal, pero hacia endosomas tardíos (Tomasetto et al., 1995b, Alpy et al., 2001).



**Figura 3. Representación esquemática de las proteínas MENTHO, MLN64 y StAR.** El porcentaje de similitud entre las secuencias es indicado en rojo y el porcentaje de identidad en azul. En el extremo amino terminal las proteínas MENTHO y MLN64 comparten un dominio que contiene cuatro segmentos de transmembrana denominado MENTAL. En el extremo carboxilo terminal MLN64 y StAR tienen un dominio de homología denominando START. Figura modificada de Alpy y cols (Alpy et al., 2002).



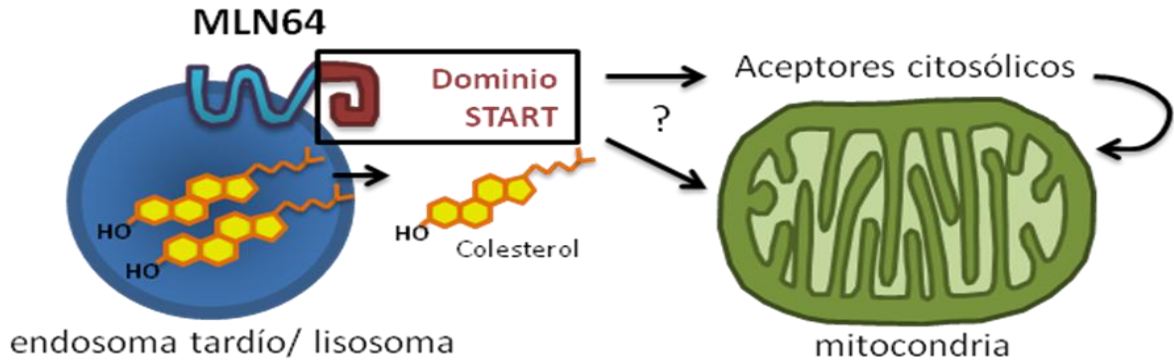
Recientemente se demostró que los dominios MENTAL de MLN64 y MENTHO son capaces de unir colesterol e interactuar de forma específica entre ellos y podían estar formando dominios discretos en la superficie de los endosomas (Alpy et al., 2005). De esta manera, la localización y topología de MLN64 en organelos endocíticos como subpoblaciones de endosomas tardíos (van der Kant et al., 2013) sugeriría que MLN64 podría capturar colesterol a nivel de la membrana del endosoma tardío, para ser extraído luego por el dominio START citoplasmático de MLN64, homólogo al de StAR (Ioannou, 2001) (Alpy and Tomasetto, 2005) y finalmente transferir el colesterol a un dominio citosólico aceptor (Alpy et al., 2005).

Adicionalmente, debido a que MLN64 y StAR poseen una alta homología e identidad en el dominio START, tienen similares funciones biológicas (Moog-Lutz et al., 1997) y a que la proteína StAR posee un papel central al favorecer la traslación de colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentran las enzimas de biosíntesis de los esteroides (citocromo P450<sub>scc</sub>), se ha postulado que MLN64 podría tener actividad esteroidogénica al ser capaz de unir y trasladar colesterol hacia la mitocondria (Watari et al., 1997, Zhang et al., 2002, Charman et al., 2010) (Figura 4).

Por las características anteriormente mencionadas, creemos que la proteína MLN64 estaría involucrada en el transporte de colesterol desde fuentes intracelulares hacia el resto de la célula. Interesantemente, estudios previos de nuestro grupo demostraron que la sobreexpresión hepática de MLN64 induce daño hepático, apoptosis y un aumento del contenido de colesterol hepático libre (Tichauer et al., 2007). Incluso, estudios de otros grupos han demostrado que la reducción de la expresión de MLN64 mediante ARN de interferencia disminuye el transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial en células CHO (Charman et al., 2010), por lo esta proteína podría tener un rol importante en el transporte de colesterol hacia la mitocondria.

Sin embargo, el mecanismo por el cual MLN64 mediaría la transferencia de colesterol a la mitocondria no es claro aún. Es posible que la proteína transfiera el colesterol desde el compartimento endosomal a un aceptor citosólico. En este sentido, se ha propuesto que los miembros de la familia de proteínas START citoplasmáticas, como STARD4 ó STARD5 podrían actuar como aceptores citoplasmáticos del colesterol endosomal de MLN64 (Clark, 2012) (Figura 4). Otra posibilidad, sugerida por Charman et al. 2010, es que MLN64 transfiera colesterol a la mitocondria a través de los sitios de contacto lisosoma-mitocondria. Además, no es posible

descartar que el dominio START de MLN64 citosólico sea proteolizado y que de esta manera transporte colesterol a la mitocondria.

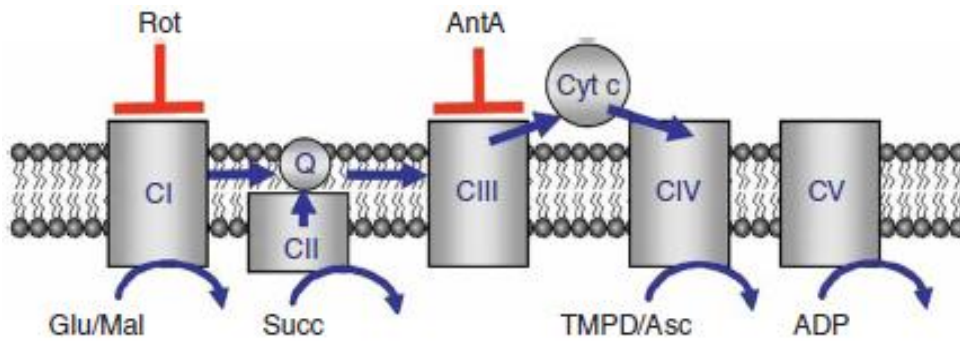


**Figura 4. Modelo de la posible función de MLN64 en el transporte intracelular de colesterol.**

MLN64 podría capturar colesterol en la membrana de endosomas tardíos/lisosomas, y a través de su dominio START transportar este colesterol a la mitocondria de manera indirecta a través de otros aceptores citosólicos o de manera directa a la mitocondria para favorecer su metabolismo a través de enzimas mitocondriales (Watari et al., 1997). Figura adaptada de Tichauer, 2005 (Tichauer, tesis de pregrado).

## 2.5 El colesterol mitocondrial y su papel en la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo

La mitocondria contiene múltiples transportadores de electrones capaces de producir ROS (Figura 5), como también posee una extensa red de defensa antioxidante. Cualquier estímulo que pueda afectar a la mitocondria puede generar un desbalance en la producción de ROS y una disminución en la defensa antioxidante o viceversa. Como la mitocondria juega un rol muy importante en el manejo del estrés oxidativo y en la producción de energía en la célula, su disfunción puede generar daños severos en la función celular (Cui et al., 2012, Vazquez et al., 2012a). Esta disfunción puede ser generada por diversos factores, como por ejemplo un desbalance en la homeostasis del colesterol y de su transporte hacia las mitocondrias y alteraciones en componentes de la cadena de transporte de electrones (Garcia-Ruiz et al., 1995).



**Figura 5. Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y la relación sustrato/inhibidor**

La cadena respiratoria mitocondrial (CRM) está formada por cinco complejos multiproteicos localizados en las crestas mitocondriales, que atraviesan la bicapa lipídica y sobresalen hacia la matriz y el espacio intermembrana, denominados complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato CoQ oxidoreductasa), complejo III (citocromo c oxidoreductasa), complejo IV (citocromo C) y complejo V (F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATP sintasa) (Boronat and Patològica, 2009).

Inhibidores de los complejos de la cadena respiratoria: Rot- rotenona (inhibidor de CI), AntA - antimicina A (inhibidor de CIII). Los sustratos usados para estimular el flujo de electrones en los complejos de la cadena respiratoria son los siguientes: Glu/Mal (glutamato + malato); Succ (succinato); tetrametil-p-fenilenediamina/ascorbato (TMPD/cytochrome c + ascorbato).

Un desbalance en la homeostasis del colesterol como la acumulación de éste en las mitocondrias se asocia a disfunción mitocondrial, aumento de estrés oxidativo y muerte celular (Violante et al., 2012, Tabas, 2002, Bosch et al., 2011, Sobo et al., 2007) en diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer (Bobba et al., 2010) y la enfermedad de Niemann Pick Tipo C (Vazquez et al., 2012a, Vazquez et al., 2012b).

Un mal funcionamiento de las mitocondrias causado por aumento en el contenido del colesterol mitocondrial se asocia a una disminución en la fluidez de la membrana mitocondrial y a un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis (Mari et al., 2009). Esto genera una disminución en la síntesis de ATP y disminución de la entrada de GSH mitocondrial (mGSH), provocando una alteración en la eficiencia de la cadena respiratoria y de la defensa antioxidante, aumentando la producción de radicales libres, el estrés oxidativo total celular y alterando la expresión de genes (Mari et al., 2006, Bosch et al., 2011, Ha et al., 2012a, Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005, Ha et al., 2012b).

El mecanismo por el cual se induciría un aumento del colesterol mitocondrial en patologías como el Alzheimer o NPC no es claro aún. Un posible escenario es que se encuentren desreguladas las vías de transporte de colesterol hacia la mitocondria. En este sentido, es interesante mencionar que resultados no publicados de nuestro laboratorio muestran un aumento en los niveles proteicos de MLN64 en modelos NPC. Por otro lado, Ha y cols, demostraron que la resistencia a la toxina letal del Anthrax se debía a una disminución en los niveles de la proteína MLN64, del contenido del colesterol mitocondrial y de la formación de ROS en macrófagos (Ha et al., 2012a). Además los estudios de Charman y cols, permiten proponer un papel de MLN64 en el transporte de colesterol desde la vía endosomal a la mitocondria, ya que demostró que la reducción de MLN64 por ARN de interferencia disminuye el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial y produce una reducción de los niveles de colesterol mitocondrial en células normales y deficientes en NPC1 (Charman et al., 2010).

Con estos antecedentes es posible plantear que un aumento de los niveles de MLN64 podría inducir un aumento del transporte de colesterol a la mitocondria, produciendo disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.

### **III. HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de MLN64 aumenta el contenido de colesterol mitocondrial, lo que produciría una disfunción mitocondrial y aumento del estrés oxidativo.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol mitocondrial, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial en un modelo in vitro.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Sobreexpresar MLN64 en células Hepa1-6 mediante un adenovirus recombinante de MLN64.
2. Determinar el contenido de colesterol mitocondrial en células infectadas con Ad.MLN64.
3. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en células Hepa1-6.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cultivo celular

La línea celular Hepa1-6 proveniente de un hepatoma de ratón fue propagada en Dulbecco's modified eagle médium (DMEM) al 10% de suero fetal bovino (SBS) a pH 7.0 y mantenida en incubador a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2. Infección con adenovirus recombinante

Las células Hepa 1-6 fueron tratadas con 3 condiciones, un grupo control sin infección, un grupo infectado con el adenovirus control que carece de la región codificante E1 (Ad.E1Δ) y el adenovirus con la región codificante para la proteína MLN64 (Ad.MLN64). La sobreexpresión de MLN64 se corroboró mediante Western blot, qPCR e inmunofluorescencia contra MLN64. La dosis usada de ambos adenovirus fue de  $1.5 \times 10^9$  partículas virales para  $2.5 \times 10^6$  células en medio DMEM al 2% y suplementadas con suero fetal bovino al 5% (Hyclone) tras 4 horas (h) de infección. Las células se obtuvieron 24 h post-infección.

### 5.3. Purificación de mitocondrias y medición del contenido de colesterol mitocondrial

Las mitocondrias se purificaron por fraccionamiento subcelular usando el kit de purificación de mitocondrias (ScienceCell) desde homogenizados de células Hepa 1-6 de acuerdo al protocolo que se detalla a continuación.

Las células Hepa1-6 se sembraron en placas de 150 mm, se infectaron con adenovirus y a las 24 h se lavaron con buffer fosfato salino (PBS 1X; NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,24 g/L, pH 7,3) (Winkler BM-1340), a 4°C y se despegaron usando un rastrillo. Luego, el contenido se traspasó a un nuevo tubo eppendorf que fue centrifugado a 500 g por 5 minutos (min) a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 750 µl de Buffer A (ScienceCell, 8268). El contenido se homogenizó usando un homogenizador Dounce vidrio-vidrio. El homogenizado total se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se centrifugó a 1000 g por 5 min a 4°C. El pellet se eliminó y el sobrenadante se centrifugó a 10.000 g por 20 min a 4°C. El pellet, que contiene la fracción de mitocondrias, nuevamente fue resuspendido en 750 µl de Buffer A y centrifugado a

10.000 g por 20 min a 4°C. Finalmente el pellet se resuspendió en 50 µl de buffer de Lisis suplementado con inhibidores de proteasa. Se chequeó la concentración de proteínas con el Kit Pierce BCA (ThermoScientific, 32106). Las muestras se guardaron a -20°C.

### **5.3.1 Western blot contra Catepsina B (marcador lisosomal), Cox IV (marcador mitocondrial), $\epsilon$ -cop (control de carga) y MLN64.**

La sobreexpresión de MLN64 inducida por la infección con el adenovirus se corroboró mediante western blot contra MLN64. La purificación de mitocondrias se corroboró mediante western blot contra Catepsina B (marcador lisosomal) y Cox IV (marcador mitocondrial). El control de carga usado en ambos casos fue  $\epsilon$ -cop.

Para realizar la electroforesis de proteínas se preparó un gel resolutivo al 15% y un concentrador al 4%. Se cargaron 50 µg de proteínas de las muestras, se sonicaron por 5 minutos y se corrieron inicialmente a 80 Volts hasta llegar al gel resolutivo y luego a 100 Volts. Luego, las proteínas se transfirieron a 400 mA por 2 h a una membrana de nitrocelulosa. Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó por 1 h en leche al 5% en PBS-tween 0,1%. La membrana fue cortada guiándose por el marcador de peso molecular. Cada membrana se incubó durante la noche (ON) a 4°C con anticuerpo primario catepsina B (Santa Cruz 64905,  $\alpha$ -mouse, 1:1000), Cox IX (Abcam 14744,  $\alpha$ -mouse, 1:3000),  $\epsilon$ -cop ( $\alpha$ -rabbit, 1:5000) y MLN64 (Abcam 3478,  $\alpha$ -rabbit, 1:1000). Las membranas se lavaron 3 veces con PBS1X y se incubaron con anticuerpo secundario  $\alpha$ -mouse (1:3000) o  $\alpha$ -rabbit (1:5000) por 2 h a temperatura ambiente según correspondiera.

### **5.3.2 Medición del contenido de colesterol mitocondrial mediante el Kit Amplex Red**

El contenido de colesterol mitocondrial se midió en la fracción mitocondrial purificada usando el Kit Amplex Red (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se alicuotaron 10 µg de proteínas de las muestras de mitocondrias purificadas de células Hepa1-6 en tubos eppendorf de 1,5 ml y a éstas se les adicionó un volumen de 50 µl de buffer de reacción 1X. Luego, se les adicionó 50 µl de solución de buffer de reacción suplementado con las enzimas Horseradish peroxidasa (2U/ml), colesterol oxidasa (2 U/ml) y colesterol esterasa (2

U/ml). Los 100  $\mu$ l de cada tubo se traspasaron a una placa 96 pocillos evitando formar burbujas y se incubó por 30 min a 37°C. Finalmente, se midió la fluorescencia a 530-560 nm de excitación y 590 nm de emisión en un fluorímetro que fue gentilmente cedido por el laboratorio de la Dra. Rommy Von Bernhardt y los datos fueron expresados en  $\mu$ g de colesterol por mg de proteínas.

#### **5.4 Inmunofluorescencia contra Cox-IV, Lamp1, MLN64 y tinción con filipina.**

Las células Hepa1-6 fueron sembradas en cubre objetos en placas de 24 pocillos y se infectaron usando  $1,5 \times 10^9$  partículas virales de Ad. MLN64 y el adenovirus control E1 $\Delta$  por  $2,5 \times 10^6$  células. Se incubaron por 24 h a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS 1X a 4°C por 5 min y se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% con sacarosa al 4% por 30 min. A continuación, se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con tritón 0,2% en PBS 1X por 15 min. Nuevamente se lavaron con PBS 1X y se bloquearon en gelatina 0,2% en PBS 1X por 1 h. Se les adicionó el anticuerpo primario MLN64 (Abcam 3478, 1:500,  $\alpha$ -rabbit), Lamp1 (Abcam 25630; 1:100,  $\alpha$ -mouse) y CoxIV (Abcam 14744,  $\alpha$ -mouse, 1:500) preparados en gelatina 0,2% en PBS 1X y se dejaron en una cámara húmeda a 4°C por toda la noche (ON). Al día siguiente se lavaron con PBS 1X y en oscuridad se adicionó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -rabbit alexa fluor 488 (1:1000) y  $\alpha$ -mouse alexa fluor 594 (1:1000) preparados en gelatina 0,2% en PBS 1X y se dejaron a temperatura ambiente (TA) por 2 h.

Para continuar con la tinción para colesterol libre se usó el compuesto químico filipina, el que se une al colesterol libre y emite fluorescencia. Las muestras fueron tratadas con glicina 1,5 mg/ml en PBS 1X por 20 min a temperatura ambiente y luego fueron teñidas con filipina 25 $\mu$ g/ $\mu$ l (disuelta en DMSO) por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.

Finalmente las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS 1X, montadas en fluoromont (Emsdiasum, USA) y se dejaron secar ON, para posteriormente observar las preparaciones al microscopio de epifluorescencia y confocal.

Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces y se analizaron 10 fotos por cada condición. La intensidad de la fluorescencia de 15 células por cada foto se midió usando el programa Image J y además, se estimó el coeficiente de Pearson para las colocalizaciones. Finalmente el resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5.

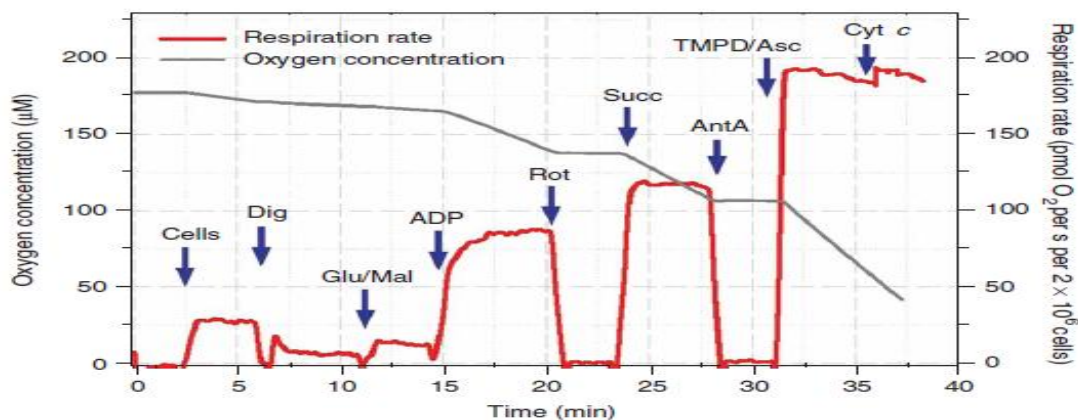


## 5.5 Determinación de la función mitocondrial

La función mitocondrial se evaluó midiendo el potencial de membrana con la sonda fluorescente Mitotracker red (Molecular Probes®) y el consumo de O<sub>2</sub> usando el equipo Oxygraph-2k (OROBOROS INSTRUMENTS).

Luego de 24 h de infección con adenovirus las células Hepa1-6 sembradas en cubreojetos en placas de 24 pocillos fueron lavadas con PBS 1X a 37°C. Posteriormente, se incubaron con la sonda Mitotracker red a una concentración 25 nM por 30 min a 37°C. A continuación las células fueron lavadas 3 veces por 10 min con PBS 1X a 37°C y fijadas con PFA al 4% y sacarosa al 4% por 30 min a 37°C. Finalmente, fueron lavadas 3 veces con PBS 1X a 4°C por 5 min y se continuó con el protocolo de inmunofluorescencia.

El consumo de O<sub>2</sub> se evaluó mediante el análisis de la respiración celular *in situ* en células Hepa1-6 permeabilizadas según el protocolo de Kuznetsov (Kuznetsov et al., 2008), como se describe en la Figura 6.



**Figura 6. Esquema de la cadena de respiración mitocondrial y el efecto de sus sustratos/Inhibidores analizada mediante el equipo Oxygraph en células Hepa1-6.**

A medida que las células respiran la concentración de oxígeno disminuye linealmente. Al adicionar digitonina (10 μg/ml) la célula se permeabiliza y la concentración de oxígeno se mantiene. Luego la respiración se registra adicionando Glutamato (10 mM) y Malato (5 mM) y a continuación se estimula agregando una concentración saturada de ADP (2 mM) para obtener la capacidad máxima de respiración mitocondrial. A continuación se inhibe el complejo I adicionando rotenona, lo que disminuye la respiración casi completamente (0,5 μM), luego se estimula el complejo II agregando succinato (10 mM). Nuevamente la respiración disminuye al inhibir el complejo III adicionando antimicina A (5 μM), para estimular nuevamente agregando tetramil-p-fenil-endiamina (TMPD, 0,5 mM) y ascorbato (2 mM). Finalmente se adiciona citocromo C para determinar daño en la membrana externa mitocondrial.

## 5.6 Determinación del estrés oxidativo

El estrés oxidativo se evaluó midiendo: el contenido de GSH celular total y mitocondrial (mGSH), la producción de superóxido mitocondrial con MitoSOX, los niveles de 4-hidroxinonenal (HNE) mediante Western blot, la expresión de 3 genes marcadores de estrés oxidativo (*ho-1*, *gr1* y *sod2*) mediante PCR en tiempo real y los niveles de nitrotirosina (Ntyr) mediante inmunofluorescencia.

### 5.6.1 Medición del contenido de GSH total, mitocondrial y citosólico.

El contenido de GSH fue determinado por el método enzimático de Tietze (Mari and Cederbaum, 2000).

Las células Hepa1-6 fueron infectadas con Ad. MLN64 y Ad.E1 $\Delta$  con una dosis de  $1,5 \times 10^9$  partículas virales para  $2,5 \times 10^6$  células por 24 h. Se lavaron con PBS 1X frío, se rasparon y el contenido se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, el que se centrifugó a 700 rpm por 5 min a TA. El pellet se resuspendió en PBS 1X. Las células fueron tratadas con ácido tricloroacético (TCA) al 10% para extraer el GSH celular.

Para obtener el GSH total del homogenizado se mezclaron 15  $\mu$ l de la muestra con 15  $\mu$ l de PBS 1X y 30  $\mu$ l de TCA al 10% y se centrifugaron a 10.000 g por 2 min a 4°C. El sobrenadante se guardó a 4°C para la posterior medición.

Para obtener el GSH mitocondrial se mezclaron 50  $\mu$ l de TCA 10%, 500  $\mu$ l de silicona:parafina (5:1), 50  $\mu$ l de digitonina (15 mg/manitol buffer digitonina) y 50  $\mu$ l de homogenizado celular y se centrifugó a 13.000 g por 1 min. Con este procedimiento el GSH mitocondrial queda en la fracción del TCA 10%.

Para obtener el GSH citosólico se centrifugó la fracción de digitonina a 10.000 g por 2 min y se mezcló con TCA al 10% en una razón 1:1.

Para medir la concentración de GSH total, citosólico y mitocondrial se siguió el aumento de absorbancia a 412 nm de una reacción que contenía 1,25 ml de Buffer A (EDTA, DNTB, NADPH, 0,5M NaPO<sub>4</sub> 34), 50  $\mu$ l de 10 U/ml glutatión reductasa (Sigma) y 50  $\mu$ l de la muestra. El incremento de la absorbancia a 412 nm fue convertido a una concentración de GSH usando una curva con cantidades conocidas de GSH (Sigma).

### **5.6.2 Determinación de la producción de estrés oxidativo mitocondrial mediante MitoSOX.**

Las células Hepa1-6 fueron sembradas en cubreobjetos en placas de 24 pocillos e infectadas con adenovirus por 24 h. Luego, bajo campana y en oscuridad fueron lavadas con PBS 1X a 37°C y se incubaron con la sonda MitoSOX (Invitrogen) en una concentración 5  $\mu$ M por 10 min a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X a 37°C y fijadas con PFA al 4% y sacarosa al 4% por 10 min a 37°C. Luego, fueron lavadas 3 veces con PBS 1X por 5 min. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados para posteriormente observar las preparaciones al microscopio.

### **5.6.3 Western blot contra HNE.**

La electroforesis de proteínas se realizó en un gel resolutivo al 12% y un concentrador al 4%. Se cargaron 50  $\mu$ g de proteínas de las muestras y se corrieron inicialmente a 80 Volts hasta llegar al gel resolutivo y luego a 100 Volts. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 400 mA por 2 h. La membrana se bloqueó por 1 h en BSA al 3% en PBS-tween 0,1%. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario HNE (Millipore, ab5605, 1:1000,  $\alpha$ -goat). Se lavó 3 veces con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -goat (Santa Cruz 2004, 1:2000) por 2 h a TA.

### **5.6.4 Extracción y cuantificación del ARN**

Las células Hepa1-6 tratadas se lavaron con PBS 1X a 4°C y fueron cosechadas con 1 ml de solución de Chomczynski (Winkler, BM-1755). El contenido se traspasó a un tubo eppendorf de 2 ml y se resuspendió 10 veces con una jeringa de 3 ml. Después, se incubó a TA por 5 min y se agregó 188  $\mu$ l de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos (seg) y se incubó por 2-3 min a TA. Se centrifugó a 12.000g por 15 min a 4°C y la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo. El ARN se precipitó con 500  $\mu$ l de isopropanol frío y se agitó por inversión vigorosamente por 15 seg. Luego, se incubó por 10 min a TA y se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C; se lavó el pellet con etanol al 75% y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4°C. Se dejó secar el precipitado a TA y se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC.

La concentración de ARN se midió en el equipo Nanodrops ND-1000 donado por la organización Humbolt y que fue ofrecido gentilmente por el laboratorio del Dr. Juan Francisco Miquel (Departamento de Gastroenterología de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile). La pureza de las muestras se cuantificó usando la razón 260/280 y 230/280. Para evaluar la integridad del ARN se preparó un gel denaturante de ARN con 0,3 g de agarosa (Axygen Biosciences, AGR-LE-100), 3 ml de buffer ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 10x (Winkler), 5,4 ml de formaldehído 37% (Winkler BM-0780) y 21,6 ml de H<sub>2</sub>O DEPC. Se cargaron 2,5 µg de las muestras mezcladas con buffer de ARN 2x compuesto por MOPS 10X, formaldehído al 37% 12,3M, buffer glicerol al 30%, azul bromofenol (AFB) al 0,25%, bromuro de etidio 10 ng/ml, H<sub>2</sub>O DEPC y se mezcló con formamida (Sigma F-7508) en una razón 1:1 y se incubaron por 10 min a 65°C. La integridad del ARN se visualizó en un gel denaturante de ARN, compuesto por 0,3 g de agarosa, 3 ml de MOPS 10x, 5,4 ml de formaldehído y 21,6 ml de H<sub>2</sub>O DEPC. El gel se corrió en buffer MOPS 1X a 70 Volts por 1 h.

#### **5.6.5 Tratamiento con ADNasas y Preparación de cADN**

2 µg del ARN total de las células Hepa1-6 fueron tratados con el kit Amplification grade DNase I (Invitrogen), para eliminar los interferentes de ADN genómico. Luego, se realizó la transcripción reversa por el kit SuperScript™ First-Strand (Invitrogen, Carlsbad, USA) usando las condiciones sugeridas por el proveedor y hexámeros al azar.

#### **5.6.6 Cuantificación genes marcadores de estrés oxidativo**

El PCR en tiempo real fue realizado con el kit Brilliant SYBR Green master mix (Stratagene, TX). El sistema de PCR tiempo real Applied Biosystem Abi 7500 de donación de la organización Humbolt fue gentilmente aportado por el laboratorio del Dr. Juan Francisco Miquel. En la reacción se usó 5 µl del cADN por cada 25 µl de volumen de reacción, 12,5 µl del SYBR green master mix, 0,375 µl de ROX (1:500), 6,125 µl de H<sub>2</sub>O y partidores específicos para cada gen (Tabla 1).

La concentración de partidores fue de 400 nM. Las condiciones para todos los genes analizados fueron las mismas. El ciclo usado fue: 10 min a 95°C; 30 seg a 95°C, apareamiento de 30 seg a

55°C y extensión de 1 min a 72°C. Este ciclo se repitió 40 veces. Los cambios en la expresión de los genes fueron determinados y normalizados a los niveles de expresión del rARN 18S usando el programa REST (relative expression software tool) (Pfaffl et al., 2002).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los niveles de transcritos de los genes de estrés oxidativo *ho-1*, *gr1*, *sod2* y *18s* por PCR tiempo real en células Hepa1-6

Gen	Partidor sentido	Partidor antisentido
<i>18S</i>	5'GTAACCCGTTGAACCCATT3'	5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3'
<i>HO-1</i>	5'CACAGCACTATGTAAAGCGTCT3'	5'TGTGCAATCTTCTTCAGGACC3'
<i>GR1</i>	5'CCACGGCTATGCAACATTTCG3'	5'GATCTGGCTCTCGTGAGGAA3'
<i>SOD2</i>	5'ACCCGTTGAACCCATTGTAAC3'	5'TGTGCAATCTTCTTCAGGACC3'

### 5.6.7 Inmunofluorescencia contra nitrotirosina.

Las células Hepa1-6 fueron sembradas en cubre objetos en placas de 24 pocillos y se infectaron usando  $1,5 \times 10^9$  partículas virales de Ad. MLN64 y el adenovirus control E1 $\Delta$  por  $2,5 \times 10^6$  células. Se incubaron por 24 h a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS 1X a 4°C por 5 min y se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% con sacarosa al 4% por 30 min. A continuación, se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con tritón 0,2% en PBS 1X por 15 min. Nuevamente se lavaron con PBS 1X y se bloquearon en gelatina 0,2% en PBS 1X por 1 hora. Se les adicionó el anticuerpo primario Ntyr (Alpha Diagnostic NITT12-A, 1:100 y 1:500,  $\alpha$ -rabbit) preparada en gelatina 0,2% en PBS 1X y se dejaron en una cámara húmeda a 4°C ON. Al día siguiente se lavaron con PBS 1X y en oscuridad se adicionó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -rabbit alexa fluor 488 (1:1000) preparados en gelatina 0,2% en PBS 1X y se dejaron a TA por 2 h, para posteriormente observar las preparaciones al microscopio.

### 5.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio de cada condición con dispersión expresada como desviación estándar. Las diferencias observadas entre los promedios de los parámetros determinados para todas las condiciones en células se valoraron estadísticamente mediante la

aplicación del test t Student para datos no pareados, usando el software de análisis estadístico Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Inc., San Diego, USA). Una diferencia entre grupos experimentales se consideró estadísticamente significativa cuando el valor p fue menor de 0,05.

El análisis de expresión de genes medido por tiempo real en los distintos modelos se realizó mediante el programa REST (relative expression software tool) (Pfaffl, 2001, Pfaffl et al., 2002), basado en test de randomización, que considera diferencia significativa con un valor p menor a 0,05.

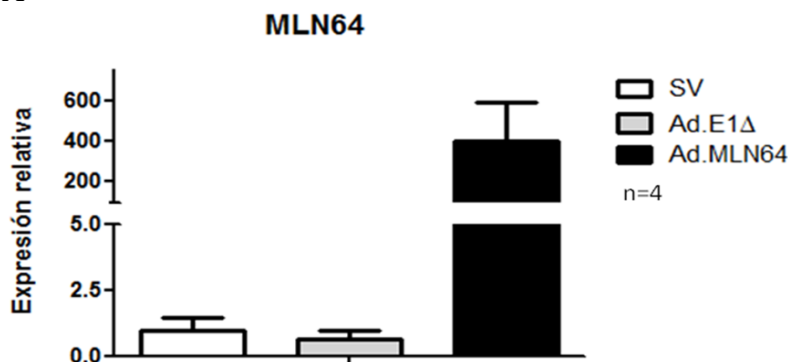
## VI. RESULTADOS

### 6.1.- Efecto de la infección con el Ad.MLN64 sobre los niveles de ARN mensajero de MLN64 y la localización subcelular de MLN64 en células Hepa1-6

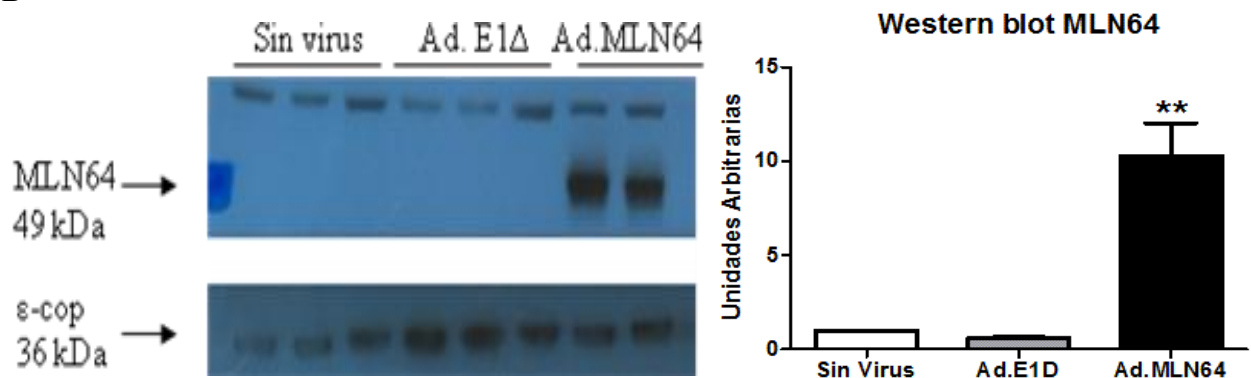
La sobreexpresión de MLN64 se corroboró mediante Western blot, inmunofluorescencia contra MLN64 y PCR en tiempo real (Figura 7A - C).

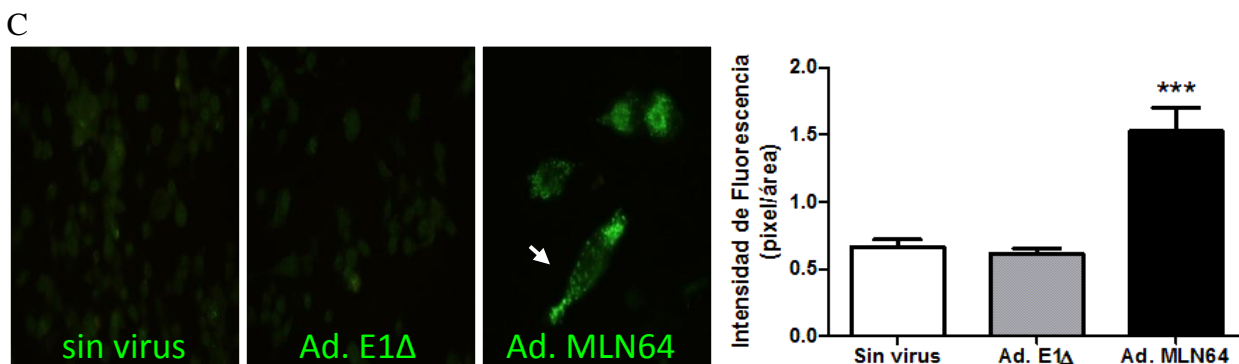
En células Hepa1-6 infectadas con adenovirus recombinante Ad.MLN64 encontramos una mayor expresión de MLN64 reflejada en un aumento de los niveles de ARN mensajero (Figura 7A) y de los niveles de la proteína MLN64 en comparación con las células infectadas con Ad. E1Δ o sin virus (Figura 7B-C). Por inmunofluorescencia vimos un aumento significativo para la señal de MLN64, además que la proteína se expresa con un patrón punteado, lo que sugiere que MLN64 se localiza en compartimientos intracelulares (Figura 7C).

A



B





**Figura 7. Efecto de la infección con el Ad.MLN64 sobre los niveles de ARN mensajero y la proteína MLN64 en la línea celular Hepa1-6.**

Las células Hepa1-6 fueron tratadas con Ad.E1Δ, Ad.MLN64 o sin virus por 24 horas. (A) Los niveles de ARN mensajero (mARN) de MLN64 se analizaron por PCR en tiempo real (n=4) y fueron normalizados por el mARN de gen que codifica para la subunidad 18S y expresados como aumento relativo frente a células Hepa1-6 sin infectar. (B) Western blot representativo de infección con Ad.MLN64, como control de carga se usó ε- Cop. La intensidad de las bandas se cuantificó usando el programa image J y se analizó usando el programa GraphPad Prism 5 (n=3). (C) Inmunofluorescencia contra MLN64. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó usando el programa image J y el resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5.

Como se mencionó anteriormente el patrón de expresión punteado perinuclear de MLN64 (Figura 7C) observado sugiere su localización en compartimientos intracelulares, pero para poder determinar más precisamente su localización subcelular se hicieron ensayos de colocalización con marcadores de mitocondrias, CoxIV y Mitotracker red y de lisosomas, Lamp 1 y Lysotracker red (Figura 8).

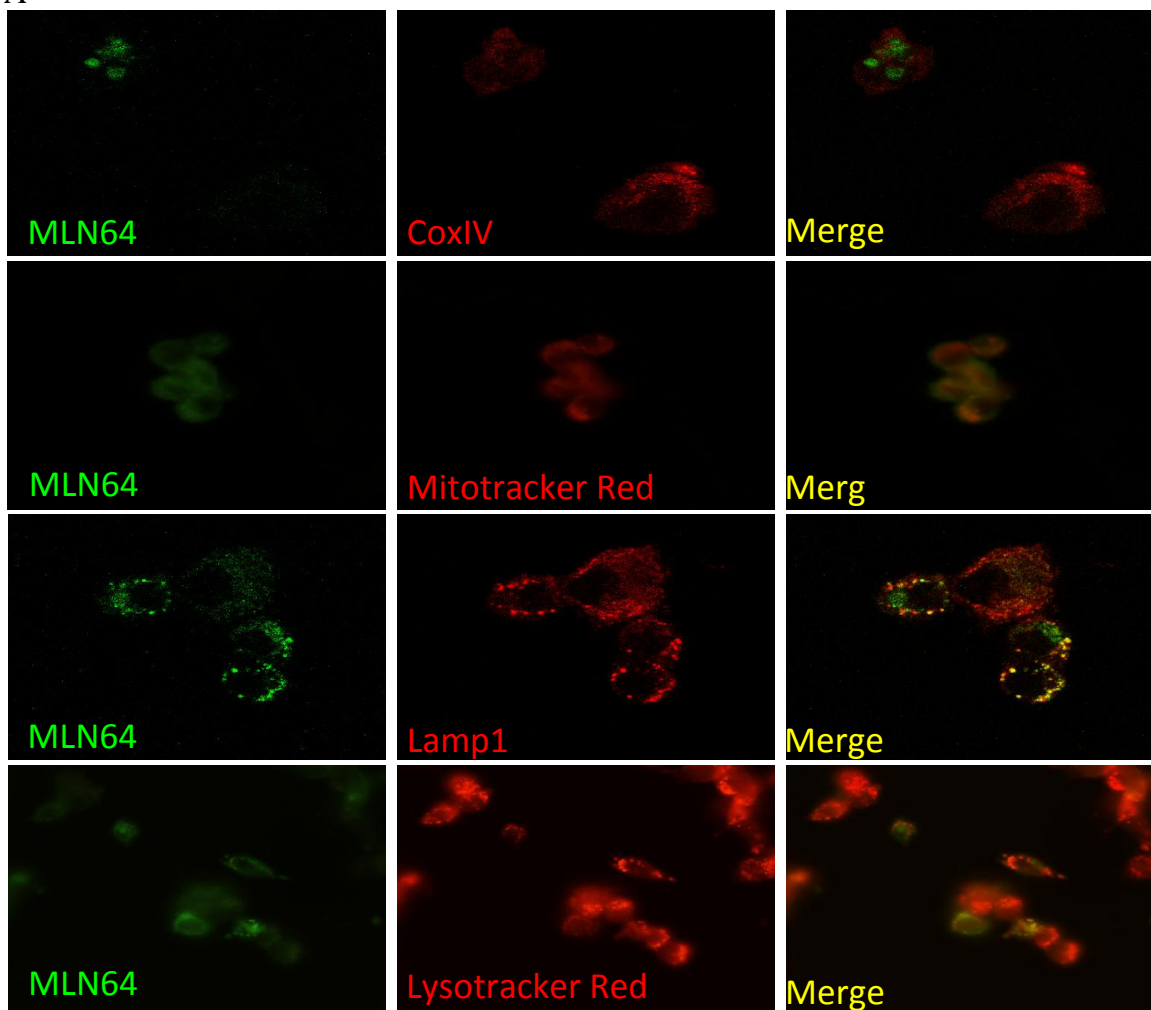
Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia y se estimó el coeficiente de Pearson para las colocalizaciones. Este coeficiente presenta un rango de valores entre -1 (correlación negativa perfecta) a +1 (correlación positiva perfecta) y 0 indicando nada de correlación.

El coeficiente de Pearson para la colocalización de MLN64 con los marcadores mitocondriales CoxIV, Mitotracker red y con los marcadores lisosomales, Lamp1 y lysotracker red fue de -0.033, 0, 0.14 y 0.12, respectivamente.

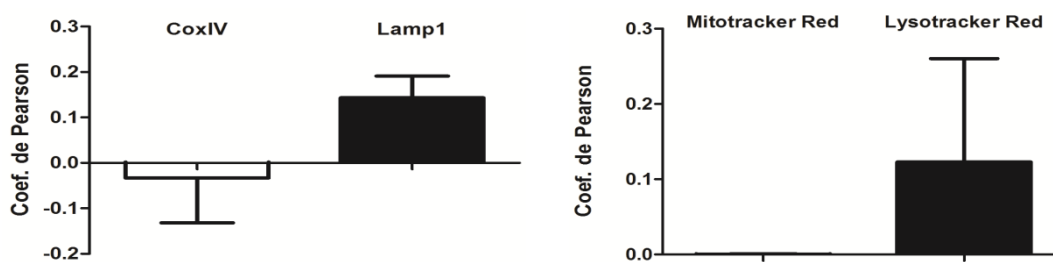
Los resultados obtenidos muestran que la infección con adenovirus recombinante para MLN64 induce una clara sobreexpresión de la proteína en las células Hepa1-6 y sugieren que la proteína sobreexpresada se localiza, al menos parcialmente, en endosomas tardíos y lisosomas.



A



B



**Figura 8. Colocalización de MLN64 con marcadores mitocondriales y lisosomales.**

Las células Hepa1-6 fueron tratadas con Ad.MLN64 por 24 horas. (A) Inmunofluorescencia de MLN64 y tinción con Mitotracker red, CoxIV, Lamp1 y Lysotracker red. (B) Coeficiente de Pearson de la colocalización de MLN64 con un marcador mitocondrial (CoxIV y mitotracker red) y lisosomal (Lamp1 y lysotracker red). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó usando el programa ImageJ y el resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism5.

## 6.2.- Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol mitocondrial en células Hepa1-6

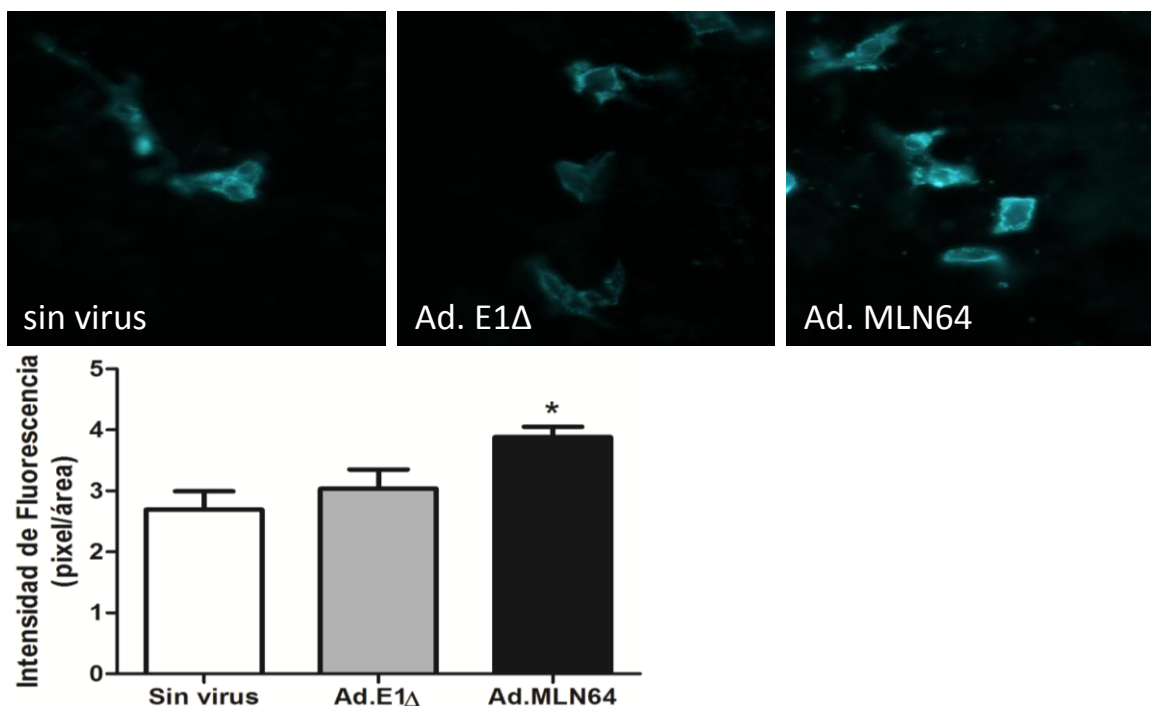
De acuerdo a nuestra hipótesis de trabajo, MLN64 mediaría el transporte de colesterol a la mitocondria. Para probar esta hipótesis se evaluó el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol libre en células Hepa1-6 usando el marcador de colesterol libre filipina y sobre el contenido de colesterol mitocondrial midiendo el contenido de colesterol de mitocondrias aisladas de estas células.

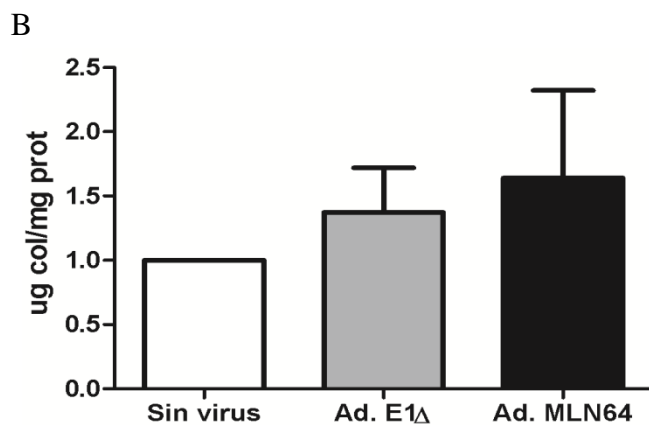
Se observó un aumento significativo en la tinción para filipina en las células infectadas con el Ad.MLN64 en comparación con las células infectadas con adenovirus Ad. E1 $\Delta$  (Figura 9A).

En mitocondrias purificadas de células hepa1-6 se encontró una tendencia de aumento del contenido de colesterol mitocondrial (Figura 9B).

Estos resultados sugerirían que proteína MLN64 podría tener un papel en el transporte de colesterol desde los endosomas tardíos y lisosomas hacia aceptores citosólicos, ó hacia a un aceptor como la mitocondria.

A





**Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el contenido de colesterol en células Hepa1-6.**

Las células Hepa1-6 fueron tratadas con Ad.MLN64, Ad.E1 $\Delta$  o sin virus por 24 horas.

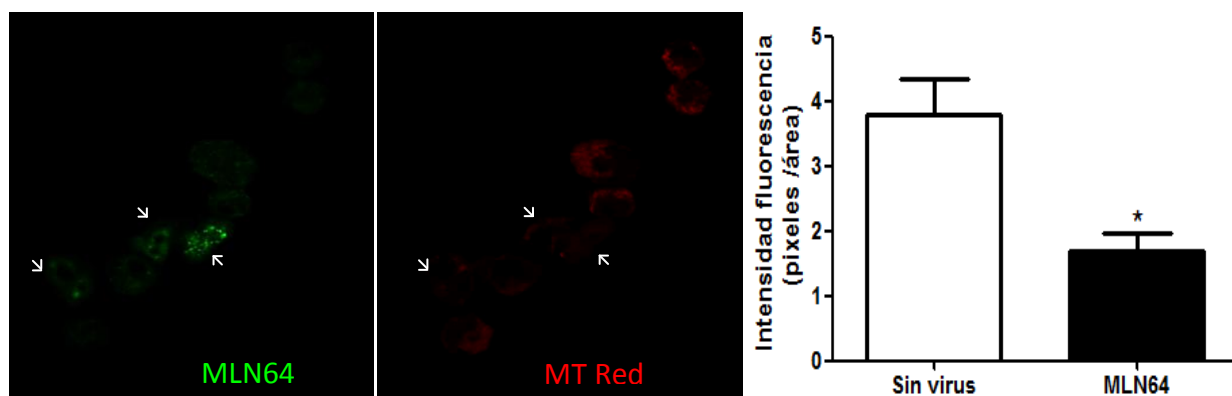
(A) Fluorescencia de filipina. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó usando el programa image J y el resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5. (B) El contenido de colesterol de mitocondrias aisladas se normalizó por los niveles de proteína y se analizó usando el programa GraphPad Prism 5. \* Diferencias consideradas significativas con un  $p \leq 0.05$ .

### 6.3.- Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la función mitocondrial en células Hepa1-6.

Como primera aproximación para determinar si existe disfunción mitocondrial en las células Hepa1-6 infectadas con el Ad.MLN64 se evaluó el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el potencial de membrana mitocondrial usando la sonda fluorescente MitoTracker Red (Molecular Probes®). Esta es una tinción fluorescente roja que marca las mitocondrias en células vivas y su acumulación depende del potencial de membrana.

Las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron una disminución significativa en el potencial de membrana mitocondrial. (Figura 10). Este resultado sugiere que la sobreexpresión de MLN64 produce una pérdida de la función mitocondrial.

A



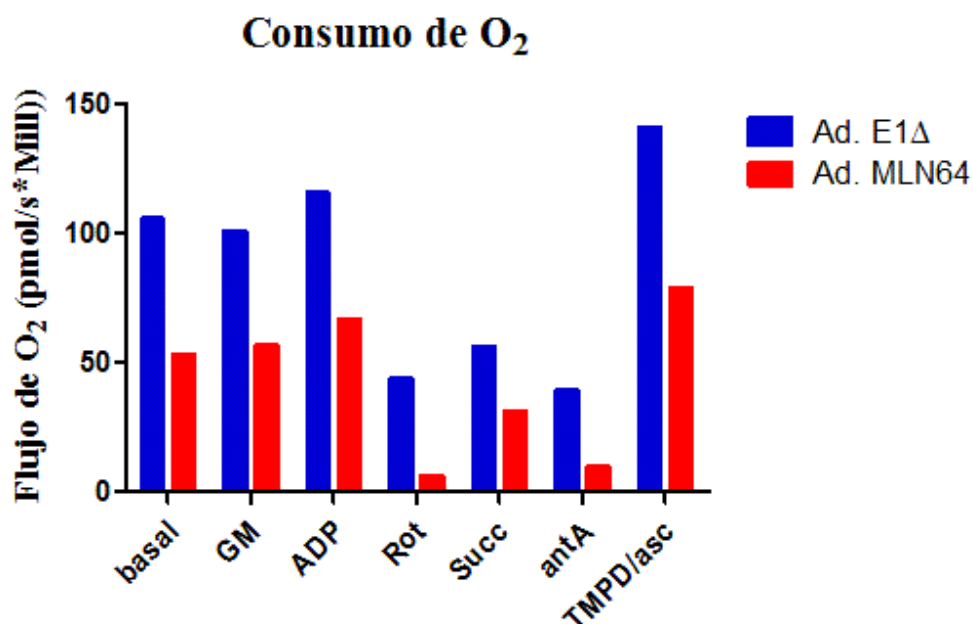
**Figura 10: Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el potencial de membrana en células Hepa1-6.**

(A) Inmunofluorescencia contra MLN64 y la sonda fluorescente Mitotracker red en células Hepa 1-6 infectadas con Ad.MLN64 por 24 horas. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional al potencial de membrana mitocondrial y se cuantificó usando el programa image J. El resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5). \* Diferencias consideradas significativas con un  $p \leq 0.05$ .

Como segunda aproximación para determinar si la sobreexpresión de MLN64 produce disfunción mitocondrial, se evaluó el consumo de  $O_2$  en células Hepa1-6 permeabilizadas y tratadas con el adenovirus recombinante Ad.E1 $\Delta$  y Ad.MLN64, usando el equipo Oxygraph-2k (Oroboros instruments).

Este equipo permite determinar si los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentran alterados.

Los resultados obtenidos en este objetivo (n=1) muestran que las células que sobreexpresan MLN64 presentan una tendencia a la disminución del consumo de oxígeno, lo que sugiere que la sobreexpresión de MLN64 produciría alteraciones en los complejos de la cadena mitocondrial (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre el Consumo de O<sub>2</sub> en células Hepa1-6.**

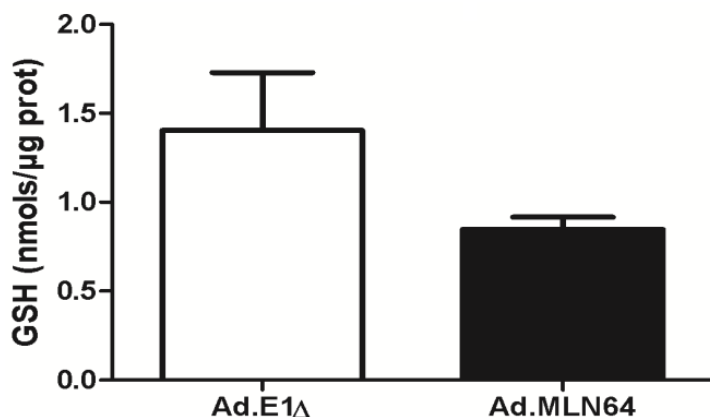
La función mitocondrial se evaluó en células Hepa1-6 infectadas con Ad.E1Δ y Ad. MLN64 por 24 horas (n=1), estimulando la respiración celular con los sustratos glutamato/malato (GM), succinato (Succ), tetrametil-p-fenilenediamina/ascorbato (TMPD/asc) y adenosindifosfato (ADP) e inhibiéndola con los inhibidores rotenona (rot) y antimicina A (antA).

En resumen, las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron una disminución significativa en el potencial de membrana mitocondrial y una tendencia a disminuir el consumo de oxígeno. Estos resultados sugieren que MLN64 induce disfunción mitocondrial, posiblemente debido a que aumentaría el contenido de colesterol mitocondrial, alterando la fluidez de la membrana y afectando el funcionamiento de la cadena respiratoria.

#### 6.4.- Efecto de la sobreexpresión de la proteína MLN64 sobre el estrés oxidativo en células Hepa1-6

Como anteriormente encontramos una tendencia al aumento del colesterol mitocondrial (Figura 9B) y se ha reportado que el mGSH disminuye cuando hay más colesterol en las mitocondrias (Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005, Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006), evaluamos el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles del glutatión reducido mitocondrial.

Las mitocondrias purificadas de células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron una tendencia de disminución en los niveles de glutatión reducido (Figura 12). Esto sugiere una disminución en la entrada de mGSH en las células que sobreexpresan MLN64 y apoyaría la hipótesis de que la proteína MLN64 transportaría colesterol hacia las mitocondrias.



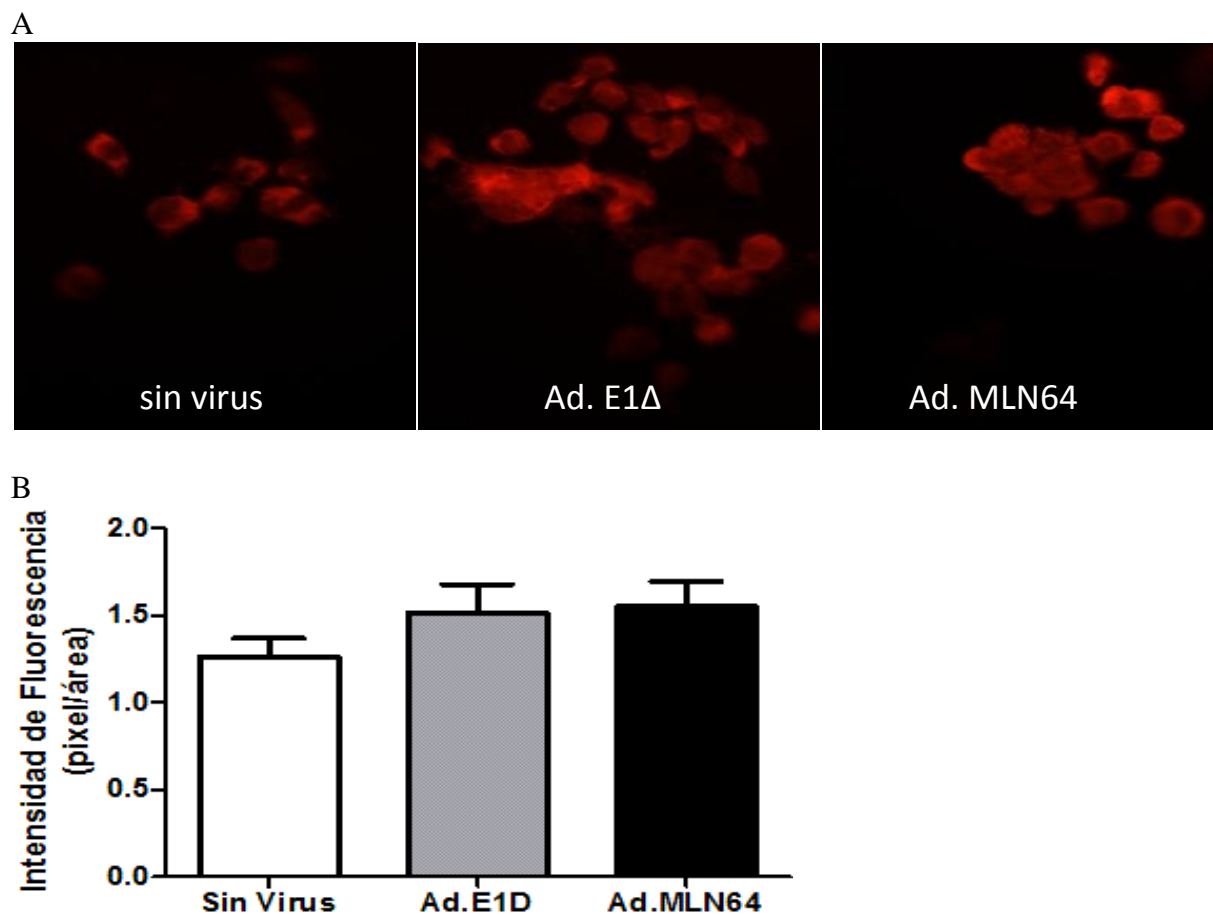
**Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de glutatión reducido mitocondrial (mGSH).**

Los niveles de glutatión reducido de mitocondrias aisladas de células Hepa1-6 infectadas con adenovirus Ad. E1Δ y Ad. MLN64 se detectaron midiendo el GSH según el método de Tietze (n=4).

A continuación para determinar si existe estrés oxidativo mitocondrial se evaluó el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la producción de superóxido mitocondrial usando la sonda fluorescente MitoSOX (Molecular Probes®). Esta es una tinción fluorescente roja que permite detectar de manera selectiva la producción de anión superóxido mitocondrial de células vivas.

La oxidación del anión superóxido produce la liberación de un producto fluorescente, que representa el grado de oxidación en la célula.

Las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 no presentaron un cambio significativo en la producción de superóxido mitocondrial comparadas con las células infectadas con el adenovirus Ad.E1 $\Delta$  (Figura 14).

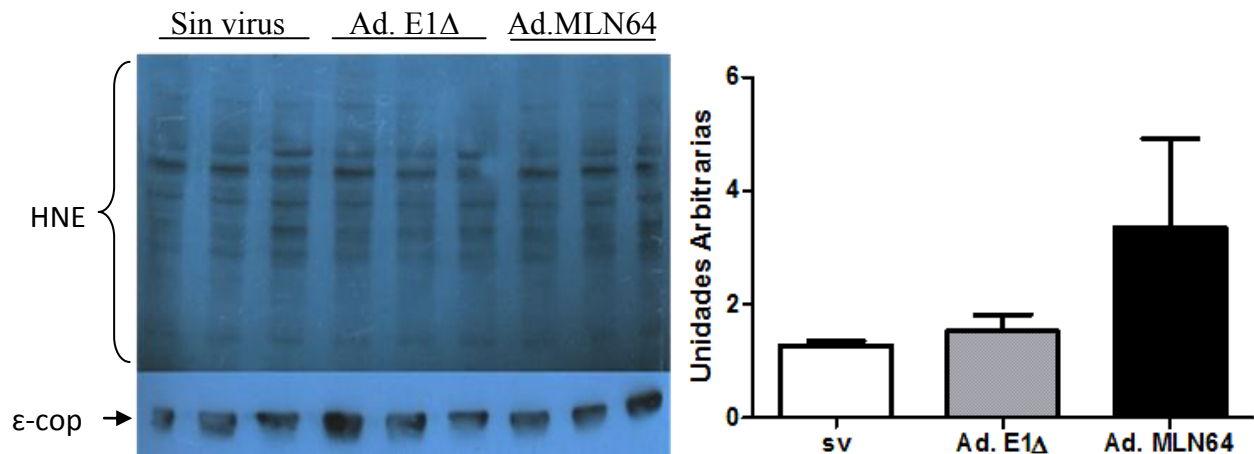


**Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la producción de superóxido mitocondrial.**

Inmunofluorescencia de la sonda fluorescente MitoSOX en células Hepa 1-6 sin infectar, e infectadas con Ad. E1 $\Delta$  y Ad.MLN64. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces (A). Se cuantificó usando el programa image J. El resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5 (B).

Como siguiente aproximación para determinar si la infección con el Ad.MLN64 aumenta el estrés oxidativo en las células Hepa1-6 se evaluó el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre

los niveles de 4-hidroxinonenal (HNE) mediante la técnica de Western blot, donde la presencia de HNE es un indicador de estrés oxidativo, ya que es un producto de la peroxidación de lípidos. Las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron una tendencia a aumentar en los niveles de 4-hidroxinonenal (Figura 13), lo que sugiere presencia de daño oxidativo.



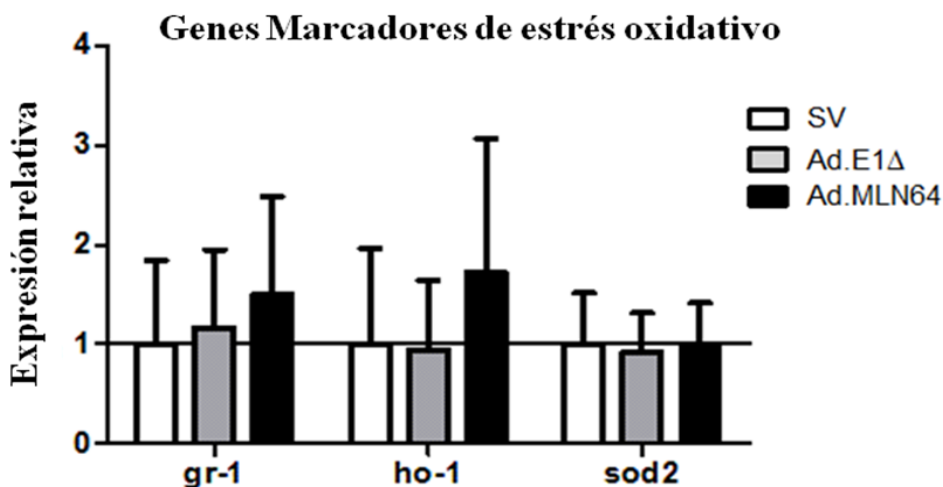
**Figura 14. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de 4-hidroxinonenal.** Western blot contra HNE de células Hepa1-6 sin infectar con adenovirus e infectadas con Ad. E1Δ y Ad. MLN64 por 24 horas (n=3). Se usó  $\epsilon$ -cop como control de carga. La intensidad de las bandas se normalizaron por el control de carga  $\epsilon$ -cop y se cuantificaron usando el programa image J. El resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5.

Después se evaluaron los niveles de estrés oxidativo en células Hepa1-6 infectadas con el adenovirus recombinante para MLN64 analizando por PCR en tiempo real 3 genes marcadores de estrés oxidativo *ho-1*, *sod2* y *gr1*.

Las células Hepa1-6 infectadas con Ad. MLN64 presentaron altos niveles de expresión de *ho1*, una tendencia al aumento de *gr1* y bajos niveles de expresión de *sod2*.

Estas alteraciones en los niveles de transcritos de genes marcadores de estrés oxidativo sugieren una asociación entre la sobreexpresión de MLN64 y el estrés oxidativo. Sin embargo, debido a la dispersión de los resultados, no pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas pero sí claras tendencias (Figura 14).



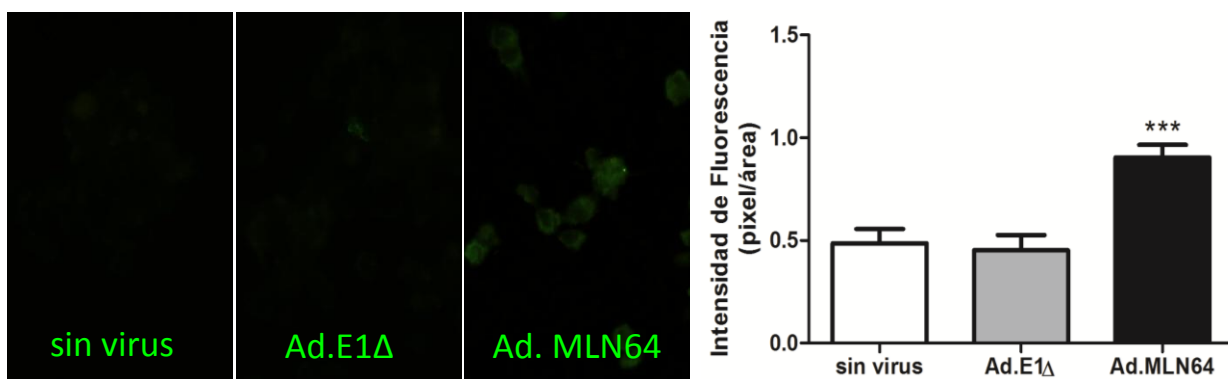


**Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre la expresión de genes marcadores de estrés oxidativo en células Hepa 1-6**

Los niveles de ARNm se normalizaron por ARNr 18S y se expresaron como aumento relativo frente a células Hepa1-6 sin infectar (n=5).

Finalmente se evaluó el efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de nitrotirosina (Ntyr) mediante inmunofluorescencia. La nitrotirosina es un indicador de estrés oxidativo ya que es un producto de la nitración de tirosina mediado por especies reactivas del nitrógeno.

Las células Hepa1-6 infectadas con Ad. MLN64 presentaron un aumento significativo en la producción de nitrotirosina (Figura 15), lo que sugeriría presencia de daño oxidativo.



**Figura 16. Efecto de la sobreexpresión de MLN64 sobre los niveles de 4-hidroxinonenal (HNE) y nitrotirosina (Ntyr) en células Hep1-6.**

Inmunofluorescencia contra nitrotirosina en células Hepa 1-6 sin infectar e infectadas con Ad. E1Δ y Ad.MLN64. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60 veces. Se cuantificó usando el programa image J. El resultado se analizó usando el programa GraphPad Prism 5.

En resumen, las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron un aumento significativo en la producción de nitrotirosina, una tendencia a aumentar de los niveles de 4-hidroxinonal, una disminución en los niveles de glutatión reducido y alteraciones en los niveles de transcritos de genes marcadores de estrés oxidativo. Estos resultados sugieren una asociación entre la sobreexpresión de MLN64 y el estrés oxidativo.

## VII. DISCUSIÓN

A continuación se discutirán los hallazgos encontrados durante el estudio, contrastándolos con la información disponible en la literatura, para analizar si la sobreexpresión de MLN64 produce un aumento del contenido de colesterol mitocondrial y si esto contribuye a la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo en hepatocitos.

### 7.1 Localización subcelular de MLN64 en células Hepa1-6

Los antecedentes de la literatura sugieren que MLN64 juega un papel importante en el tráfico intracelular de colesterol. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual MLN64 mediaría el transporte intracelular de colesterol no está completamente dilucidado (Watari et al., 1997, Rigotti et al., 2010, Charman et al., 2010).

Interesantemente, la proteína MLN64 está compuesta por dos dominios distintos, el dominio amino terminal denominado MENTAL capaz de unir colesterol a la membrana (Alpy et al., 2005) y el dominio carboxilo terminal denominado START, el cual es capaz de transportar colesterol desde fuentes intracelulares a la mitocondria de tejidos esteroideogénicos estimulando la síntesis de hormonas esteroidales (Stocco and Clark, 1996). La presencia de estos dominios podría sugerir un papel importante de la proteína MLN64 en la unión y transporte de colesterol hacia la mitocondria (Charman et al., 2010, Watari et al., 1997), mediando el transporte de colesterol desde el compartimento endosomal de MLN64 a un aceptor citosólico (Charman et al., 2010). En este sentido, se han planteado diversos modelos que explicarían como MLN64 media el transporte de colesterol hacia el resto de la célula; algunos de estos modelos proponen que los miembros de la familia de proteínas START citoplasmáticas, como STARD4 ó STARD5 (Clark, 2012), podrían actuar como aceptores citoplasmáticos del colesterol endosomal de MLN64.

Otra posibilidad, sugerida por Charman et al. 2010, es que MLN64 transfiera colesterol a la mitocondria a través de los sitios de contacto lisosoma-mitocondria. Y finalmente, otro modelo propone que el dominio START de MLN64 citosólico podría ser proteolizado y de esta manera transportar colesterol a la mitocondria.

Nuestros resultados muestran que la infección con el adenovirus recombinante indujo una clara sobreexpresión de MLN64 en las células Hepa1-6 (Figura 7) y su patrón punteado que colocalizaba en parte con marcadores endosomales y lisosomales (Figura 8). Esto se correlaciona con lo visto por otros investigadores, quienes determinaron que MLN64 se encuentra en organelos endocíticos como subpoblaciones de endosomas tardíos (van der Kant et al., 2013).

## **7.2 MLN64 y su papel en la homeostasis del colesterol**

Los antecedentes de la literatura han mostrado que la sobreexpresión hepática de MLN64 aumenta el contenido de colesterol hepático libre (Tichauer et al., 2007) y que una mutante de MLN64 que carece del dominio START induce acumulación de colesterol libre en lisosomas de células CHO y COS-1 (Zhang et al., 2002), e incluso que la reducción de la expresión de MLN64 mediante ARN de interferencia disminuye el transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial en células CHO deficientes en la proteína lisosomal NPC1 (Charman et al., 2010).

Todos estos antecedentes permiten plantear un papel para MLN64 en la mantención del flujo de colesterol endosomal, en la homeostasis del colesterol intracelular y en el transporte de colesterol desde la vía endosomal hacia la mitocondria (Zhang et al., 2002, Alpy et al., 2002, Rigotti et al., 2010).

Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de tinción del marcador de colesterol libre filipina en comparación con las células sin infectar e infectadas con el Ad. E1Δ (Figura 9A). Estos resultados concuerdan con resultados previos publicados de nuestro laboratorio, donde las células que sobreexpresaron MLN64 mostraron altos contenidos de colesterol libre (Tichauer et al., 2007). Lamentablemente, no fue posible realizar co-tinciones de filipina con marcadores de organelos como lisosomas o mitocondrias para determinar en qué localización subcelular se acumula este colesterol libre, sin embargo fuimos capaces de aislar mitocondrias con un alto grado de pureza y pudimos evaluar el contenido de colesterol en la fracción mitocondrial (Figura 9B). El resultado obtenido muestra una tendencia al aumento del contenido de colesterol en mitocondrias de células infectadas con Ad.MLN64. Aunque este

aumento no fue estadísticamente significativo, esto podría deberse al bajo contenido de colesterol de las mitocondrias.

Aunque no es claro como el tráfico o expresión de MLN64 está involucrado en los mecanismos de regulación del colesterol en la célula se ha sugerido que MLN64 mediaría en el tráfico de colesterol hacia la mitocondria (Charman et al., 2010, Ha et al., 2012a).

Al analizar nuestros resultados encontramos que la tendencia al aumento en el contenido de colesterol mitocondrial en células hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 refuerza la idea del papel de la proteína MLN64 como transportador de colesterol a este organelo.

### **7.3 MLN64 y disfunción mitocondrial**

Cuando el potencial de membrana mitocondrial está por debajo de  $-60\text{mV}$  se abre el poro de permeabilidad transicional (*permeability transition pore*, PTP), separándose las capas interna de la externa de la membrana mitocondrial, con la liberación al citoplasma de especies reactivas de oxígeno (ROS) que aceleran la generación de radicales libres altamente tóxicos para la célula (Arsenijevic et al., 2000, Negre-Salvayre et al., 1997, Vidal-Puig et al., 2000).

Interesantemente, cambios en el contenido de colesterol de la membrana mitocondrial se asocian a alteraciones de la función mitocondrial, aumento de estrés oxidativo y muerte celular (Violante et al., 2012, Tabas, 2002, Bosch et al., 2011, Sobo et al., 2007). Además, un mal funcionamiento de las mitocondrias causado por aumento en el contenido del colesterol mitocondrial se asocia a disminución en la fluidez de la membrana mitocondrial a un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis, provocando una alteración en la eficiencia de la cadena respiratoria y de la defensa antioxidante, aumentando la producción de radicales libres, el estrés oxidativo total celular y alterando la expresión de genes (Mari et al., 2006, Mari et al., 2009, Ha et al., 2012b, Bosch et al., 2011, Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005, Robledo, 2010, Ha et al., 2012a).

De nuestros resultados obtenidos, a pesar de no encontrar un mayor contenido de colesterol mitocondrial en células Hepa1-6 con sobreexpresión de MLN64, si encontramos disminución del potencial de membrana mitocondrial (Figura 10), lo que se asocia a disfunción mitocondrial. Este

resultado se correlaciona con lo visto por Ha y cols., quienes vieron que la sobreexpresión de MLN64 provocaba hiperpolarización de la membrana mitocondrial (Ha et al., 2012a).

Como la mitocondria es la principal fuente reguladora de ROS en la célula, su mal funcionamiento puede provocar un exceso de estas especies reactivas, provocando la alteración de distintos componentes celulares como lípidos, proteínas, membranas, entre otros, e incluso ocasionar alteraciones en la eficiencia de la cadena respiratoria y de la defensa antioxidante (Mari et al., 2009).

Por lo anterior, evaluamos si la sobreexpresión de MLN64 afectaba los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial al analizar los niveles de consumo de  $O_2$  en células Hepa1-6 infectadas con el Ad.MLN64. Al analizar nuestros resultados encontramos que la sobreexpresión de la proteína MLN64 afectaba todos los complejos de la mitocondria, especialmente los complejos I y III, reflejado en una drástica disminución en la respiración de células Hepa1-6 al agregar los inhibidores rotenona y antimicina A (Figura 11). Dado que nuestros resultados previos indicaron pérdida del potencial de membrana, correlacionamos estos resultados con lo descrito por Ha y cols, quienes mostraron que los inhibidores rotenona y antimicina A, causaban una disfunción mitocondrial al agravar la producción de ROS e inducir hiperpolarización en la membrana mitocondrial, afectando la cadena respiratoria mitocondrial (Ha et al., 2012a). Esta disminución en el consumo de  $O_2$  podría deberse a alteraciones en la membrana de las células Hepa1-6 ó a modificaciones en los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente en los complejos I y III.

#### **7.4 MLN64 y estrés oxidativo**

Los antecedentes de la literatura han mostrado que un aumento del contenido de colesterol mitocondrial produce pérdida de la fluidez de la membrana mitocondrial, lo que genera una disminución de de la entrada del glutatión (GSH) hacia la mitocondria, provocando una alteración en la eficiencia de la cadena respiratoria y de la defensa antioxidante (Mari et al., 2009), llevando a la muerte celular.

Al analizar los niveles de glutatión reducido, una de las moléculas más importantes en la defensa antioxidante de la célula, encontramos una marcada tendencia a su disminución (Figura 12). Esto podría deberse a la pérdida en el potencial de membrana mitocondrial, asociado a disminución de la fluidez de la membrana, causada por el aumento del contenido de colesterol en ella. Este resultado concuerda con lo reportado por Mari y cols., quienes vieron que un incremento de colesterol depositado en la membrana mitocondrial provocaba alteraciones en el transporte de GSH, lo que se traducía en una disminución en los niveles de éste (Mari et al., 2006).

Dado que la pérdida de potencial de membrana puede desencadenar un aumento en la producción de ROS (Choi et al., 2009, Kirkland and Franklin, 2007), nosotros evaluamos si la sobreexpresión de MLN64 causaba aumento en la producción de superóxido mitocondrial. De nuestros resultados obtenidos, al analizar los niveles del anión superóxido mitocondrial, el cual es un radical libre que en exceso puede llegar a ser tóxico para la célula, no encontramos cambios significativos en la producción de superóxido mitocondrial tanto en células Hepa1-6 tratadas con el adenovirus Ad.E1Δ y Ad.MLN64 (Figura 13), sin embargo, encontramos una clara tendencia al aumento al comparar con las células Hepa1-6 sin infectar. Esta tendencia al aumento es concordante con lo visto por Ha y cols, quienes vieron que la sobreexpresión de MLN64 generaba producción de ROS mitocondrial.

Cuando las defensas antioxidantes no son capaces de controlar los niveles de ROS se observa un aumento en la formación de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que es transformado rápidamente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por acción de SOD1, SOD2 y SOD3 (Colombrita et al., 2003, Andersen, 2004). El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con metales de transición reducidos para producir el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) que es altamente reactivo y mucho más dañino para la célula. El radical hidroxilo puede llevar a la formación de hidroperóxidos lipídicos que producen una variedad de aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, como 4-hidroxinonal (4HNE) (Robledo, 2010), donde este último es un indicador de presencia de estrés oxidativo, ya que es un producto de la peroxidación de lípidos. Las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron una tendencia a aumentar en los niveles de 4-hidroxinonal (Figura 14).

Al analizar la expresión de genes de estrés oxidativo en células Hepa1-6 infectadas con Ad. MLN64 observamos altos niveles de expresión de *ho1*, proteína que cataliza el paso limitante de la degradación de grupos hemo, una tendencia al aumento de *gr1*, enzima clave en la producción de GSH y muy bajos niveles de expresión de *sod2*, enzima que transforma el superóxido a peróxido en mitocondrias, en comparación con las células infectadas con Ad. E1Δ. Sin embargo, debido a que nuestros resultados tuvieron una elevada dispersión, no pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de transcritos de los distintos genes analizados, pero si claras tendencias que sugerirían una clara asociación entre la sobreexpresión de MLN64 y el estrés oxidativo (Figura 15).

Interesantemente, la nitrotirosina es un producto de la nitración de tirosina mediado por especies reactivas del nitrógeno tales como el anión peroxinitrito y dióxido de nitrógeno y es considerado como un marcador del estrés oxidativo dependiente de óxido nítrico (NO). Las células Hepa1-6 que sobreexpresan MLN64 presentaron un aumento significativo en la producción de nitrotirosina (Figura 16). Ambos resultados sugerirían presencia de daño oxidativo concordando con lo visto por Ha y cols, quienes detectaron aumento de ROS en células TIR provocado por la expresión de MLN64 (Ha et al., 2012a).

Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de MLN64 genera disfunción mitocondrial por pérdida del potencial de membrana en mitocondrias, posiblemente causado por el incremento del contenido de colesterol en la membrana, generando que esta pierda su capacidad transportadora y por ende afectando el ingreso de GSH a la mitocondria, además de alterando la cadena respiratoria.

En conjunto los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que MLN64 participaría en el transporte de colesterol hacia la mitocondria y que su sobreexpresión induciría disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.

Se requieren de más estudios para determinar los mecanismos por los cuales MLN64 mediaría el transporte de colesterol a la mitocondria. Así también, sería interesante evaluar si MLN64 es un buen blanco terapéutico a regular para disminuir el transporte de colesterol a la mitocondria en enfermedades con alteraciones lipídicas.



## VIII. CONCLUSIONES

La infección de las células Hepa 1-6 con un adenovirus recombinante para MLN64 induce la sobreexpresión de la proteína MLN64.

La sobreexpresión de MLN64 aumenta el contenido de colesterol libre celular e induce disfunción mitocondrial y se asocia a la inducción de marcadores de estrés oxidativo en células Hepa1-6.

## IX. LITERATURA CITADA

- ALPY, F., LATCHUMANAN, V. K., KEDINGER, V., JANOSHAZI, A., THIELE, C., WENDLING, C., RIO, M. C. & TOMASETTO, C. 2005. Functional characterization of the MENTAL domain. *J Biol Chem*, 280, 17945-52.
- ALPY, F., LEGUEUX, F., BIANCHETTI, L. & TOMASETTO, C. 2009. [START domain-containing proteins: a review of their role in lipid transport and exchange]. *Med Sci (Paris)*, 25, 181-91.
- ALPY, F., STOECKEL, M. E., DIERICH, A., ESCOLA, J. M., WENDLING, C., CHENARD, M. P., VANIER, M. T., GRUENBERG, J., TOMASETTO, C. & RIO, M. C. 2001. The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem*, 276, 4261-9.
- ALPY, F., WENDLING, C., RIO, M. C. & TOMASETTO, C. 2002. MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain. *J Biol Chem*, 277, 50780-7.
- ANDERSEN, J. K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, 10 Suppl, S18-25.
- ARSENJEVIC, D., ONUMA, H., PECQUEUR, C., RAIMBAULT, S., MANNING, B. S., MIROUX, B., COUPLAN, E., ALVES-GUERRA, M. C., GOUBERN, M., SURWIT, R., BOUILLAUD, F., RICHARD, D., COLLINS, S. & RICQUIER, D. 2000. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 26, 435-9.
- BLOKS, V. W., BAKKER-VAN WAARDE, W. M., VERKADE, H. J., KEMA, I. P., WOLTERS, H., VINK, E., GROEN, A. K. & KUIPERS, F. 2004. Down-regulation of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 expression associated with altered sterol fluxes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 47, 104-12.
- BOBBA, A., PETRAGALLO, V. A., MARRA, E. & ATLANTE, A. 2010. Alzheimer's proteins, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction interplay in a neuronal model of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2010.
- BOSCH, M., MARI, M., HERMS, A., FERNANDEZ, A., FAJARDO, A., KASSAN, A., GIRALT, A., COLELL, A., BALGOMA, D., BARBERO, E., GONZALEZ-MORENO, E., MATIAS, N., TEBAR, F., BALSINDE, J., CAMPS, M., ENRICH, C., GROSS, S. P., GARCIA-RUIZ, C., PEREZ-NAVARRO, E., FERNANDEZ-CHECA, J. C. & POL, A. 2011. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol*, 21, 681-6.
- BRIGGS, M. R., YOKOYAMA, C., WANG, X., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I.

- Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem*, 268, 14490-6.
- CLARK, B. J. 2012. The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *J Endocrinol*, 212, 257-75.
- CLARK, B. J., WELLS, J., KING, S. R. & STOCCO, D. M. 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*, 269, 28314-22.
- COLOMBRITA, C., CALABRESE, V., STELLA, A. M., MATTEI, F., ALKON, D. L. & SCAPAGNINI, G. 2003. Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228, 517-24.
- CUI, H., KONG, Y. & ZHANG, H. 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct*, 2012, 646354.
- CHARMAN, M., KENNEDY, B. E., OSBORNE, N. & KARTEN, B. 2010. MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *J Lipid Res*, 51, 1023-34.
- CHOI, K., KIM, J., KIM, G. W. & CHOI, C. 2009. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res*, 6, 213-22.
- DIETSCHY, J. M., TURLEY, S. D. & SPADY, D. K. 1993a. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*, 34, 1637-59.
- DIETSCHY, J. M., WOOLLETT, L. A. & SPADY, D. K. 1993b. The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. *Ann N Y Acad Sci*, 676, 11-26.
- DUBE, E., ETHIER-CHIASSON, M. & LAFOND, J. 2013. Modulation of cholesterol transport by insulin-treated gestational diabetes mellitus in human full-term placenta. *Biol Reprod*, 88, 16.
- ERICKSON, R. P. 2013. Current controversies in Niemann-Pick C1 disease: steroids or gangliosides; neurons or neurons and glia. *J Appl Genet*, 54, 215-24.
- ESPENSHADE, P. J. 2006. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci*, 119, 973-6.
- FERNANDEZ-CHECA, J. C. & KAPLOWITZ, N. 2005. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204, 263-73.

- GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A., MORALES, A., KAPLOWITZ, N. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 1995. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*, 48, 825-34.
- GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2006. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3, S3-6.
- GARCIA-RUIZ, C., MARI, M., COLELL, A., MORALES, A., CABALLERO, F., MONTERO, J., TERRONES, O., BASANEZ, G. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2009. Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol Histopathol*, 24, 117-32.
- HA, S. D., PARK, S., HAN, C. Y., NGUYEN, M. L. & KIM, S. O. 2012a. Cellular adaptation to anthrax lethal toxin-induced mitochondrial cholesterol enrichment, hyperpolarization, and reactive oxygen species generation through downregulating MLN64 in macrophages. *Mol Cell Biol*, 32, 4846-60.
- HA, S. D., PARK, S., HAN, C. Y., NGUYEN, M. L. & KIM, S. O. 2012b. Cellular Adaptation to Anthrax Lethal Toxin-Induced Mitochondrial Cholesterol Enrichment, Hyperpolarization, and ROS Generation through Down-regulating MLN64 in Macrophages. *Mol Cell Biol*.
- HORTON, J. D., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109, 1125-31.
- IKONEN, E. 2006. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev*, 86, 1237-61.
- IKONEN, E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 125-38.
- IOANNOU, Y. A. 2001. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 657-68.
- ISHIBASHI, S. 1994. [LDL-receptor-related protein]. *Nihon Rinsho*, 52, 3177-83.
- KIRKLAND, R. A. & FRANKLIN, J. L. 2007. Bax affects production of reactive oxygen by the mitochondria of non-apoptotic neurons. *Exp Neurol*, 204, 458-61.
- KUZNETSOV, A. V., VEKSLER, V., GELLERICH, F. N., SAKS, V., MARGREITER, R. & KUNZ, W. S. 2008. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*, 3, 965-76.
- LANGE, Y. & STECK, T. L. 1997. Quantitation of the pool of cholesterol associated with acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 272, 13103-8.

- LANGE, Y., YE, J. & CHIN, J. 1997. The fate of cholesterol exiting lysosomes. *J Biol Chem*, 272, 17018-22.
- LEHTO, M. & OLKKONEN, V. M. 2003. The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim Biophys Acta*, 1631, 1-11.
- LEIVA, A., VERDEJO, H., BENITEZ, M. L., MARTINEZ, A., BUSSO, D. & RIGOTTI, A. 2011. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 217, 299-307.
- MA, K. L., RUAN, X. Z., POWIS, S. H., CHEN, Y., MOORHEAD, J. F. & VARGHESE, Z. 2008. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology*, 48, 770-81.
- MARI, M., CABALLERO, F., COLELL, A., MORALES, A., CABALLERIA, J., FERNANDEZ, A., ENRICH, C., FERNANDEZ-CHECA, J. C. & GARCIA-RUIZ, C. 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*, 4, 185-98.
- MARI, M. & CEDERBAUM, A. I. 2000. CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*, 275, 15563-71.
- MARI, M., MORALES, A., COLELL, A., GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2685-700.
- MAXFIELD, F. R. & TABAS, I. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, 438, 612-21.
- MOOG-LUTZ, C., TOMASETTO, C., REGNIER, C. H., WENDLING, C., LUTZ, Y., MULLER, D., CHENARD, M. P., BASSET, P. & RIO, M. C. 1997. MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer*, 71, 183-91.
- NAKAMUTA, M., FUJINO, T., YADA, R., YADA, M., YASUTAKE, K., YOSHIMOTO, T., HARADA, N., HIGUCHI, N., KATO, M., KOHJIMA, M., TAKETOMI, A., MAEHARA, Y., NAKASHIMA, M., KOTOH, K. & ENJOJI, M. 2009. Impact of cholesterol metabolism and the LXRA $\alpha$ -SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, 23, 603-8.
- NEGRE-SALVAYRE, A., HIRTZ, C., CARRERA, G., CAZENAVE, R., TROLY, M., SALVAYRE, R., PENICAUD, L. & CASTEILLA, L. 1997. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J*, 11, 809-15.
- PATTERSON, M. C., HENDRIKSZ, C. J., WALTERFANG, M., SEDEL, F., VANIER, M. T. & WIJBURG, F. 2012. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol Genet Metab*, 106, 330-44.

- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. & DEMPFFLE, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30, e36.
- PONTING, C. P. & ARAVIND, L. 1999. START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci*, 24, 130-2.
- PUGLIELLI, L., TANZI, R. E. & KOVACS, D. M. 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci*, 6, 345-51.
- RIGOTTI, A., COHEN, D. E. & ZANLUNGO, S. 2010. STARTing to understand MLN64 function in cholesterol transport. *J Lipid Res*, 51, 2015-7.
- RIGOTTI, A., MIETTINEN, H. E. & KRIEGER, M. 2003. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev*, 24, 357-87.
- RIGOTTI, A., TRIGATTI, B. L., PENMAN, M., RAYBURN, H., HERZ, J. & KRIEGER, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12610-5.
- ROBLEDO, F. 2010. *Análisis de marcadores de estrés oxidativo en modelos in vivo e in vitro de la enfermedad Niemann-Pick tipo C*, Pontificia Universidad Católica de Chile. .
- ROHLMANN, A., GOTTHARDT, M., HAMMER, R. E. & HERZ, J. 1998. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest*, 101, 689-95.
- SCHROEPFER, G. J., JR. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev*, 80, 361-554.
- SOBO, K., LE BLANC, I., LUYET, P. P., FIVAZ, M., FERGUSON, C., PARTON, R. G., GRUENBERG, J. & VAN DER GOOT, F. G. 2007. Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS One*, 2, e851.
- SOCCIO, R. E., ADAMS, R. M., ROMANOWSKI, M. J., SEHAYEK, E., BURLEY, S. K. & BRESLOW, J. L. 2002. The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6943-8.
- SOCCIO, R. E. & BRESLOW, J. L. 2003. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem*, 278, 22183-6.

- STOCCO, D. M. & CLARK, B. J. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*, 17, 221-44.
- STRAUSS, J. F., 3RD, LIU, P., CHRISTENSON, L. K. & WATARI, H. 2002. Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. *Steroids*, 67, 947-51.
- TABAS, I. 2002. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*, 110, 905-11.
- TICHAUER, J. E., MORALES, M. G., AMIGO, L., GALDAMES, L., KLEIN, A., QUINONES, V., FERRADA, C., ALVAREZ, A. R., RIO, M. C., MIQUEL, J. F., RIGOTTI, A. & ZANLUNGO, S. 2007. Overexpression of the cholesterol-binding protein MLN64 induces liver damage in the mouse. *World J Gastroenterol*, 13, 3071-9.
- TOMASETTO, C., MOOG-LUTZ, C., REGNIER, C. H., SCHREIBER, V., BASSET, P. & RIO, M. C. 1995a. Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains. *FEBS Lett*, 373, 245-9.
- TOMASETTO, C., REGNIER, C., MOOG-LUTZ, C., MATTEI, M. G., CHENARD, M. P., LIDEREAU, R., BASSET, P. & RIO, M. C. 1995b. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics*, 28, 367-76.
- VAN DER KANT, R., ZONDERVAN, I., JANSSEN, L. & NEEFJES, J. 2013. Cholesterol binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *J Lipid Res*.
- VAZQUEZ, M. C., BALBOA, E., ALVAREZ, A. R. & ZANLUNGO, S. 2012a. Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 205713.
- VAZQUEZ, M. C., DEL POZO, T., ROBLEDO, F. A., CARRASCO, G., PAVEZ, L., OLIVARES, F., GONZALEZ, M. & ZANLUNGO, S. 2011. Alteration of gene expression profile in Niemann-Pick type C mice correlates with tissue damage and oxidative stress. *PLoS One*, 6, e28777.
- VAZQUEZ, M. C., MARTINEZ, P., ALVAREZ, A. R., GONZALEZ, M. & ZANLUNGO, S. 2012b. Increased copper levels in in vitro and in vivo models of Niemann-Pick C disease. *Biometals*, 25, 777-86.
- VIDAL-PUIG, A. J., GRUJIC, D., ZHANG, C. Y., HAGEN, T., BOSS, O., IDO, Y., SZCZEPANIK, A., WADE, J., MOOTHA, V., CORTRIGHT, R., MUOIO, D. M. & LOWELL, B. B. 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*, 275, 16258-66.
- VIOLANTE, R., OLIVEIRA, J. H., YOON, K. H., REED, V. A., YU, M. B., BACHMANN, O. P., LUDEMANN, J. & CHAN, J. Y. 2012. A randomized non-inferiority study comparing the addition of exenatide twice daily to sitagliptin or switching from sitagliptin to exenatide twice

daily in patients with Type 2 diabetes experiencing inadequate glycaemic control on metformin and sitagliptin. *Diabet Med*, 29, e417-e424.

WANG, X., BRIGGS, M. R., HUA, X., YOKOYAMA, C., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 268, 14497-504.

WATARI, H., ARAKANE, F., MOOG-LUTZ, C., KALLEN, C. B., TOMASETTO, C., GERTON, G. L., RIO, M. C., BAKER, M. E. & STRAUSS, J. F., 3RD 1997. MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8462-7.

WOOD, W. G., SCHROEDER, F., AVDULOV, N. A., CHOCHINA, S. V. & IGBAVBOA, U. 1999. Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease. *Lipids*, 34, 225-34.

XIAOPING, Z. & FAJUN, Y. 2012. Regulation of SREBP-Mediated Gene Expression. *Sheng Wu Wu Li Hsueh Bao*, 28, 287-294.

ZHANG, M., LIU, P., DWYER, N. K., CHRISTENSON, L. K., FUJIMOTO, T., MARTINEZ, F., COMLY, M., HANOVER, J. A., BLANCHETTE-MACKIE, E. J. & STRAUSS, J. F., 3RD 2002. MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem*, 277, 33300-10.