

Caracterización funcional de la proteína StarD7

Aspectos bioquímicos, celulares y moleculares

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS DE

JÉSICA BELÉN FLORES MARTÍN

Director de Tesis: Dra. Susana Genti-Raimondi



Departamento de Bioquímica Clínica

CIBICI – CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 2015

Directora de Tesis:

Dra. Susana Genti-Raimondi

Comisión Evaluadora:

Dra. María Cecilia Sánchez

Dra. Graciela Borioli

Dra. Beatriz Caputto

Evaluable externo:

Dra. Alicia Jawerbaum

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	
SECCIÓN 1: LOS LÍPIDOS Y SU TRANSPORTE EN CÉLULAS EUCARIOTAS	8
1.1. Características y distribución de los lípidos en las células eucariotas	8
1.2. Transporte intracelular de lípidos: rol de las proteínas transportadoras de lípidos	12
1.3. Los lípidos como mensajeros primarios y secundarios	15
SECCIÓN 2: LA FAMILIA DE PROTEÍNAS START	16
2.1. Diversidad de la familia de proteínas con dominio START	16
2.2. Subfamilia StarD1/StAR	17
2.3. Subfamilia StarD4	19
2.4. Subfamilia StarD2/PCTP	20
2.5. Subfamilia RhoGAP-START	21
2.6. Subfamilia de proteínas START con dominios tioesterasa	21
2.7. STARD9, único miembro de la subfamilia	22
2.8. Mecanismos moleculares de acción de las proteínas START	23
2.9. Las proteínas START y el metabolismo de lípidos	24
SECCIÓN 3: LA PROTEÍNA StarD7	26
3.1. Características estructurales y bioquímicas de StarD7	26
3.2. Interacción StarD7-lípidos	28
3.3. Expresión de StarD7	30
3.4. Regulación transcripcional de StarD7	32
3.4.1. Regulación de la expresión de StarD7 por β -catenina/TCF4	32
3.4.2. Regulación de la expresión de StarD7 por cAMP y el steroidogenic factor 1	33
3.4.3. <i>Cross-talk</i> entre β -Catenina/TCF4 y SF-1	34

SECCIÓN 4: METABOLISMO/TRANSPORTE LIPÍDICO Y HOMEOSTASIS CELULAR	36
4.1. El complejo de Golgi, el transporte vesicular y el metabolismo de lípidos	36
4.2. El retículo endoplásmico y la homeostasis lipídica	37
4.3. El estrés de retículo endoplásmico como respuesta a la desregulación lipídica	39
4.4. La participación de los lípidos y las lipoproteínas de transferencia en la progresión tumoral	42
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	46
RESULTADOS	
I. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 EN LA EXPRESIÓN DE GENES	48
1.1. Ensayo de microarreglos de oligonucleótidos (<i>Microarrays</i>)	49
1.2. Estudios relacionados al transportador de eflujo ABCG2	50
1.2.1. El silenciamiento de StarD7 reduce la expresión de ABCG2	50
1.2.2. El silenciamiento de StarD7 altera la funcionalidad de ABCG2	52
1.2.3. La sobre-expresión de StarD7 incrementa los niveles de ABCG2	55
II. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 EN LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR	
2.1. La reducción de StarD7 disminuye la biosíntesis <i>de novo</i> de glicerofosfolípidos	57
2.2. El silenciamiento de StarD7 genera fragmentación del aparato de Golgi	58
2.3. La disminución de la proteína StarD7 produce estrés del retículo endoplásmico	62
2.4. StarD7 protege a las células del estrés oxidativo	65
III. ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 EN DIFERENTES PROCESOS CELULARES	
3.1. El silenciamiento de StarD7 disminuye la proliferación celular	69
3.2. El silenciamiento de StarD7 disminuye la migración celular	70
3.3. Las células tratadas con siRNA contra StarD7 presentan mayor adhesión celular	72
3.4. StarD7 regula la diferenciación de las células trofoblásticas	72
IV. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON StarD7	76
4.1. Líneas celulares estables que sobre-expresan StarD7	76
4.2. Ensayos de inmunoprecipitación/ LC-MS-MS	78
DISCUSIÓN	82

CONCLUSIONES	95
MATERIALES Y MÉTODOS	
MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	99
Construcción de plásmidos recombinantes	99
Purificación de ARN total de células eucariotas en cultivo	101
Reacción de Transcriptasa Reversa	101
Semi-cuantificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	102
PCR en tiempo real	102
Preparación de extractos proteicos totales para ensayos de <i>western blot</i>	103
Medición de la síntesis <i>de novo</i> de glicerofosfolípidos	103
Microarreglos de oligonucleótidos	103
MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR	105
Cultivo de líneas celulares eucariotas	105
Preparación de líneas celulares estables usando transfección e infección lentiviral	105
Transfección transiente con plásmidos de expresión	107
Silenciamiento de StarD7 endógena	107
Viabilidad celular/Citotoxicidad	110
Ensayo de acumulación/eflujo de mitoxantrona	110
Detección de especies reactivas del oxígeno	111
Migración celular: Ensayos de reparación de la herida (<i>wound healing</i>)	111
Ensayo en <i>transwell</i>	112
Proliferación celular: Ensayos de incorporación de bromodeoxiuridina	112
Ensayo de incorporación de ³ H-timidina	113
Adhesión celular	113
Tratamiento con brefeldina A	114
Microscopía electrónica	114
MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS	115
Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido: <i>western blot</i>	115
Inmunofluorescencia de células	116
Análisis de la fusión celular	117

Medición de la secreción de β hCG	117
Inmunoprecipitación y preparado de las muestras para espectrometría de masas	117
ANÁLISIS DE LOS DATOS	121
ANEXO	122
BIBLIOGRAFÍA	129

RESUMEN

La proteína StarD7 (*START domain containing 7*) pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio START, que se caracteriza por unir y/o transportar moléculas lipofílicas, participando en el transporte, metabolismo y señalamiento intracelular lipídico. Mutaciones de alguno de los genes que codifican para estas proteínas con dominio START y/o modificaciones en la expresión están asociadas a procesos patológicos, desórdenes genéticos, enfermedades autoinmunes y tumores.

En este trabajo de tesis se realizaron diferentes aproximaciones experimentales a los fines de comprender el rol de StarD7 en la fisiología celular. Se utilizaron modelos de líneas celulares trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma (JEG-3 y BeWo), la línea HTR8/SVneo derivada de tejido placentar de primer trimestre y otras líneas celulares epiteliales.

Inicialmente se realizó en la línea celular JEG-3 un análisis global de la expresión de transcritos evaluando el efecto del silenciamiento de StarD7. Los resultados demostraron expresión diferencial de un gran número de genes, entre estos: Cnx43, TWIST1, MBD2, TGFβRII, ABCG2, THSD7A, SMURF2, KDELC1 y NID1 fueron validados mediante qRT-PCR. Estos hallazgos podrían conducir a identificar genes candidatos dependientes de StarD7 probablemente relacionados a su función celular.

Se demostró, en todas las líneas celulares silenciadas con siRNA contra StarD7, una disminución en los niveles del transcritos y la proteína ABCG2 (*ATP binding cassette subfamily G member 2*) el cual codifica para un transportador de eflujo de lípidos/xenobióticos. Por el contrario se observó que la sobre-expresión de StarD7 aumenta los niveles proteicos de ABCG2, indicando una correlación positiva entre ambas proteínas. Además, las células deficientes de StarD7 presentaron una menor actividad del transportador y mayor susceptibilidad a la droga antineoplásica mitoxantrona.

Ensayos de inmunofluorescencia y de microscopía electrónica en células silenciadas contra StarD7 revelaron fragmentación del aparato de Golgi con una marcada alteración en las estructuras subcelulares: con retículo endoplásmico (RE) dilatado, desorden en el sistema de endomembranas y numerosas mitocondrias con morfología anormal localizadas alrededor del núcleo. Estos resultados se acompañaron con una disminución en la biosíntesis *de novo* de fosfolípidos y cambios en la expresión de proteínas y genes involucrados en la respuesta de estrés del RE. Adicionalmente se demostró que las células silenciadas fueron

más sensibles a una injuria estresora con una mayor producción de especies reactivas del oxígeno e incremento en los niveles de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1.

Además, se observó que la depleción de StarD7 conduce a una disminución en la proliferación y migración celular, aumentando la adhesión celular. A su vez, en las líneas de origen trofoblástico JEG-3 y BeWo se observó un incremento en la diferenciación celular.

Finalmente, ensayos de inmunoprecipitación de proteínas de células que sobreexpresan StarD7 y análisis de espectrometría de masa, permitieron identificar algunas proteínas que interactuarían con StarD7. Entre estas posibles moléculas se ubican *ubiquitin ligasas tipo Cul3*, proteínas adaptadoras de Cul3 (con dominios KLHL, BTB o KELCH, sugiriendo que StarD7 podría regular la actividad de Cul3. Adicionalmente StarD7 interactuaría con el complejo *argonauta GW182* (TNRC6A y B).

En resumen en este trabajo de tesis se ha demostrado que la proteína transportadora de lípidos StarD7 participa y contribuye a mantener tanto la homeostasis intracelular así como los procesos fisiológicos fundamentales de proliferación, migración y diferenciación celular. Estos hallazgos fueron confirmados en diferentes líneas epiteliales tanto de origen trofoblástico como no trofoblástico sugiriendo que StarD7 tiene un rol funcional conservado.

ABSTRACT

StarD7 protein (START domain containing 7) belongs to the superfamily of proteins with START domain, which are implicated in lipid transport, metabolism, and signaling. Mutations in the genes that code for these proteins and/or changes in its expression are associated with pathological processes, genetic disorders, autoimmune diseases, and tumors.

In this thesis, different experimental approaches for the purpose of understanding the role of StarD7 in cell physiology were conducted. Models of trophoblastic cell lines derived from choriocarcinoma (BeWo and JEG-3), the HTR8/SVneo cell line derived from first placental tissue and others epithelial cell lines were used.

Initially, a global analysis of gene expression in silenced-StarD7 JEG-3 cells was performed. The results showed differential expression of a large number of genes, and the levels of some of them (Cnx43, TWIST1, MBD2, TGF β RII, ABCG2, THSD7A, SMURF2, KDELC1 and NID1) were validated by qRT-PCR. These findings could lead to identify StarD7-dependent genes probably related to its cellular function.

In relation to the ABCG2 (ATP binding cassette subfamily G member 2) transcript which encodes for a lipid/xenobiotics efflux transporter, it was observed, in all StarD7-silenced cell lines, a decrease in the levels of the ABCG2 transcript and protein. On the other hand, it was showed that overexpression of StarD7 increases the ABCG2 protein levels, indicating a positive correlation between both proteins. In addition, cells lacking StarD7 presented a deficit in the activity of this protein, and increased susceptibility of cells to antineoplastic drug mitoxantrone.

Immunofluorescence and ultrastructural assays revealed fragmentation of the apparatus of Golgi and a marked alteration in subcellular structures with dilated endoplasmic reticulum (RE), disorder in the system of endomembranes with numerous mitochondria with abnormal morphology located around the nucleus. In addition, it was determined that the novo biosynthesis of phospholipids was decreased.

Also, the depletion of StarD7 originated changes in the expression of proteins and genes involved in the stress response of RE. Additionally, it was shown that silenced cells were more sensitive against an injury with increased production of reactive species of oxygen and increased levels of the antioxidant enzyme heme oxygenase-1.

Additionally, the silencing of StarD7 led to a decrease in the cell proliferation and migration, increasing cellular adhesion. Moreover, in trophoblast cell lines, JEG-3 and BeWo, silenced against StarD7 an increase biochemical and morphological differentiation markers was observed.

Finally, protein immunoprecipitation and mass spectrometry analyses of cells that over-express StarD7 allow it to identify some proteins that interact with StarD7. Among them, ubiquitin ligases type Cul3 and adaptor proteins of Cul3 KLHL, BTB, and KELCH domains were found, suggesting that StarD7 could regulate the activity of Cul3. Additionally StarD7 would interact with Argonaut GW182 complex (TNRC6A and B) suggesting that StarD7 could be a component of the cellular silencing machinery.

In summary, in this thesis work it was demonstrated that the lipid transfer StarD7 protein participates and contributes to maintain intracellular homeostasis as well as fundamental physiological processes of cellular migration, proliferation, and differentiation. These findings were confirmed in different epithelial cell lines from trophoblastic as non trophoblastic origin suggesting that StarD7 has a conserved functional role.

ABREVIATURAS

ABCG2: *ATP binding cassette subfamily G member 2*

ATF6: *Activating transcription factor 6*

BFA: Brefeldina A

BrdU: Bromodeoxiuridina

CERT/StarD11: *Ceramida transport protein*

Cnx43: *Connexin 43*

COPI y II: *Coat protein complex I y coat protein complex II;*

CREB: *cAMP response element-binding protein*

CTB: Citotrofoblasto

CTBv: CTB velloso

Cul3: *Cullin 3*

DAG: Diacilglicerol

GRP78/BiP: *78 kDa Glucose-regulated protein/Binding immunoglobulin protein*

GSK3: *Glycogen synthase kinase 3β*

GTT1: *Gestational trophoblastic tumour 1*

HA: Hemoaglutinina

HO-1: Hemo oxigenasa-1

IRE1: *Inositol-requiring 1*

KDEL1: *KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1*

LC-MS-MS: Cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrómetros de masa en tándem

LEF1: *Lymphoid enhancer-binding factor 1*

LPA: Ácido lisofosfatídico

LTPs: Proteínas de transferencia de lípidos

MTX: Mitoxantrona

MBD2: *Methyl-CpG binding domain protein 2*

NID1: *Nidogen-1*

OSB/ORP: *Oxysterol-binding protein/OSBP-related proteins*

PA: Ácido fosfatídico

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PERK: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*

PDI: *Protein disulfide isomerase*

PI: Fosfatidilinositol

PITP: *Phosphatidylinositol transfer protein*

PS: Fosfatidilserina

RE: Retículo endoplásmico

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SCM: Sitios de contacto entre membranas

SF-1: *Steroidogenic factor 1*

siC: *siRNA Scrambled*

siD7: *siRNA dirigido contra la secuencia del ARN mensajero de StarD7*

siRNA: *Small interfering RNA*

SM: Esfingomielinina

SMURF2: *SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2*

SREBP: *Sterol regulatory element binding protein*

StAR: *Steroidogenic acute regulatory protein*

StarD7: *START domain containing 7*

START: *Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer*

STB: Sinciciotrofoblasto

S1P: Esfingosina-1-fosfato

TA: Temperatura ambiente

TCA: Tricloroacético

TCF4: *T Cell-specific transcription factor 4*

TGFβRII: *Transforming growth factor beta receptor II*

THSD7A: *Thrombospondin type I domain containing 7A*

TWIST1: *Twist homolog 1*

UPR: *Unfolded Protein Response*

βhCG: *Human chorionic gonadotropin-β*

INTRODUCCIÓN

SECCIÓN 1

LOS LÍPIDOS Y SU TRANSPORTE EN CÉLULAS EUCARIOTAS

Los lípidos son moléculas hidrofóbicas pequeñas que poseen una inmensa diversidad estructural. Son componentes vitales de numerosos procesos biológicos constituyendo los elementos esenciales para la formación de las membranas biológicas (fosfolípidos, y esfingolípidos), de proteínas específicas (miristoilación, palmitoilación), o como sustratos para la producción de energía metabólica (ácidos grasos) así como moléculas de señalamiento celular (fosfoinosítidos, ceramida, DAG) (van Meer et al., 2008).

Una célula eucariota superior contiene más de 1.000 especies diferentes de lípidos, los cuales no se distribuyen homogéneamente entre las membranas intracelulares. Cada organela tiene una composición lipídica característica requerida para una adecuada función celular. La funcionalidad de los lípidos está determinada por su concentración local, que varía entre las organelas, entre las dos caras de la bicapa lipídica e incluso en el plano lateral de la membrana. Muchas enfermedades, tales como la aterosclerosis, la diabetes tipo II, los desórdenes de almacenamiento lisosomal, entre otras, se asocian con defectos en la cantidad, calidad y/o distribución de los lípidos intracelulares (Prinz, 2010).

1.1. Características y distribución de los lípidos en las células eucariotas

Los principales lípidos estructurales en las membranas eucariotas son los **glicerofosfolípidos**, formados por dos cadenas de ácidos grasos y un grupo éster de fosfato en la cabeza polar unidos a un esqueleto de glicerol (Fig. 1). Los principales son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA). Cada clase de fosfolípido contiene una multitud de especies moleculares definidas por la longitud y el grado de saturación en sus cadenas alifáticas. Tanto la composición de la cabeza polar, como la cadena alifática influyen en las propiedades físicas de la membrana.

PC representa más del 50% de los fosfolípidos en la mayoría de las células eucariotas. Contiene mayoritariamente ácido palmítico o ácido esteárico en la posición del carbono 1 del glicerol y ácidos grasos insaturados de 18 carbonos: oleico, linoleico o linolénico en la posición del carbono 2 del glicerol. Facilitado por su forma cilíndrica, PC se auto-ensambla

espontáneamente en bicapas cerradas que adoptan un estado cristalino líquido a temperatura fisiológica, proporcionando una matriz estable y fluida a las membranas celulares (Fig. 2) (van Meer et al., 2011; Holthuis et al., 2014).

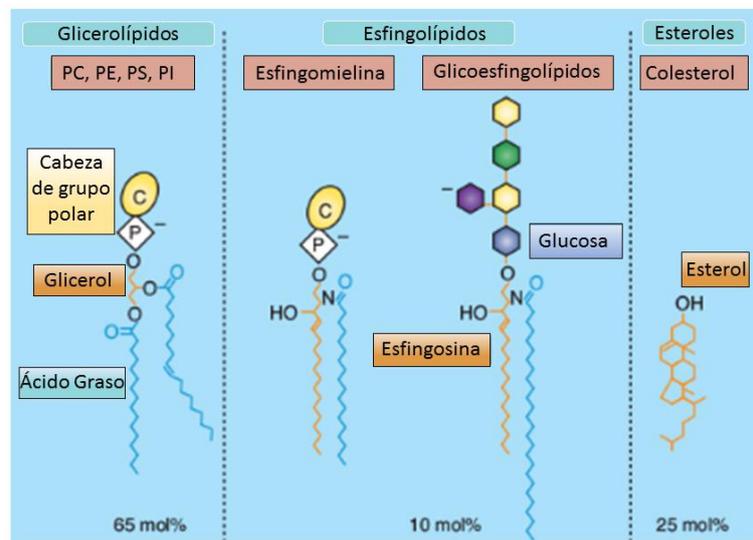


Figura 1. Las tres principales clases de lípidos presentes en las membranas de los mamíferos. Extraído de van Meer et al., 2011.

PE es un fosfolípido de forma cónica que impone una curvatura negativa a la membrana debido a su grupo polar relativamente pequeño, promoviendo la formación de defectos de empaquetamiento que facilitan la fusión de membranas, influyendo en la unión y actividad de las proteínas de membranas periféricas. A pesar de su relativamente baja abundancia, PS y PI son determinantes claves de la membrana por su superficie de carga y por mediar en las interacciones funcionales con proteínas de membranas periféricas e integrales que poseen regiones cargadas positivamente (Marsh, 2007; Holthuis et al., 2014).

Los **esfingolípidos** contienen principalmente cadenas alifáticas trans-insaturadas o saturadas, ligadas a un esqueleto de serina. Esta estructura hidrofóbica, denominada ceramida, está decorada con un grupo polar: fosfocolina en el caso de esfingomielina (SM) o con sacáridos en el caso de los glicoesfingolípidos. Debido a la composición de su cadena alifática, la SM forma un cilindro estrecho más alto que PC, aumentando la densidad de empaquetado en la membrana. En consecuencia, a temperaturas fisiológicas existe una bicapa de SM en una fase de gel sólido con cadenas alifáticas inmóviles.

Los **esteroles** son lípidos apolares con un núcleo inflexible formado por cuatro anillos fusionados, siendo el colesterol el más predominante en los mamíferos. Los esteroides hacen rígidas las membranas, reduciendo la flexibilidad de las cadenas alifáticas insaturadas

vecinas, aumentando así el espesor de la membrana y la impermeabilidad a los solutos (Holthuis et al., 2014).

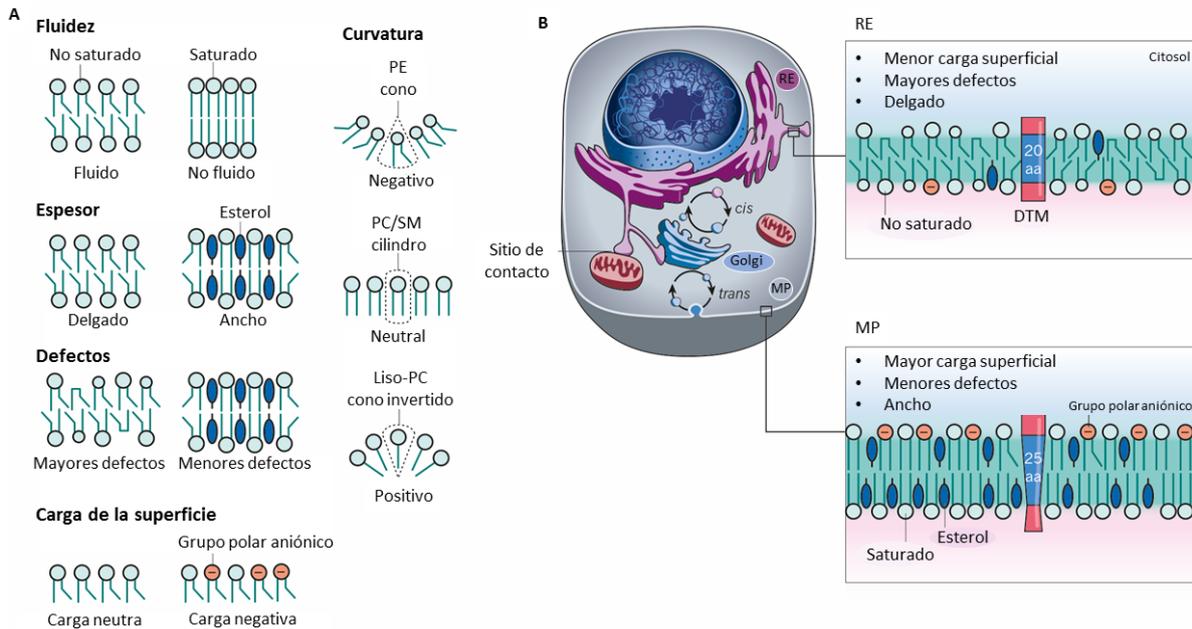


Figura 2. Las membranas de las organelas secretoras tempranas y tardías tienen distintas composiciones lipídicas y propiedades físicas. **A)** Las propiedades físicas de la membrana están influenciadas por la composición lipídica. **B)** El retículo endoplásmico (RE) tiene una bicapa delgada y lípidos neutros hacia la superficie citoplasmática adaptada para su función biogénica. La membrana plasmática (MP) tiene una bicapa de mayor grosor que el RE con lípidos de carga negativa hacia la superficie citoplasmática adaptada para su función de barrera. Estos contrastes en las propiedades físicas se reflejan en la longitud (20 aa y 25 aa, respectivamente) y geometría de los dominios de transmembrana (TMDs) de las proteínas residentes de membrana plasmática y del RE. El aparato de Golgi es un orgánulo polarizado y multi-cisternal que posee también composición lipídica única. Extraído de Holthuis et al., 2014.

El retículo endoplásmico (RE) es el principal sitio de síntesis de lípidos en la célula, proporcionando una gran parte de los lípidos a la membrana del aparato de Golgi y a la membrana plasmática debido a que estos orgánulos secretores distales tienen poca o nula capacidad para producir sus propios lípidos.

Los *lipid droplets* también participan en la síntesis de los ésteres de esteroides y triglicéridos. Los esteroides representan 5 mol% de los lípidos en el RE, pero abundan en el trans-Golgi y la membrana plasmática (30-40 mol%) (Holthuis et al., 2014).

La mayor parte de los esfingolípidos se sintetizan en el lumen del trans-Golgi a partir de la ceramida suministrada por el RE y se acumulan en la membrana plasmática, mientras

que sus niveles son bajos en el RE. Por otra parte, los fosfolípidos de la membrana plasmática son más saturados que los del RE debido a una remodelación sustancial de sus cadenas alifáticas.

Aproximadamente el 45% de los fosfolípidos de la mitocondria son sintetizados de forma autónoma por la organela, mayoritariamente PE, PA y cardiolipina presente en la membrana interna mitocondrial (van Meer et al., 2008). La composición lipídica de los endosomas y lisosomas es similar a la de la membrana plasmática, pero contienen ácido lisobifosfatídico. Los peroxisomas y las mitocondrias tienen composiciones lipídicas similares a las del RE (Fig. 3).

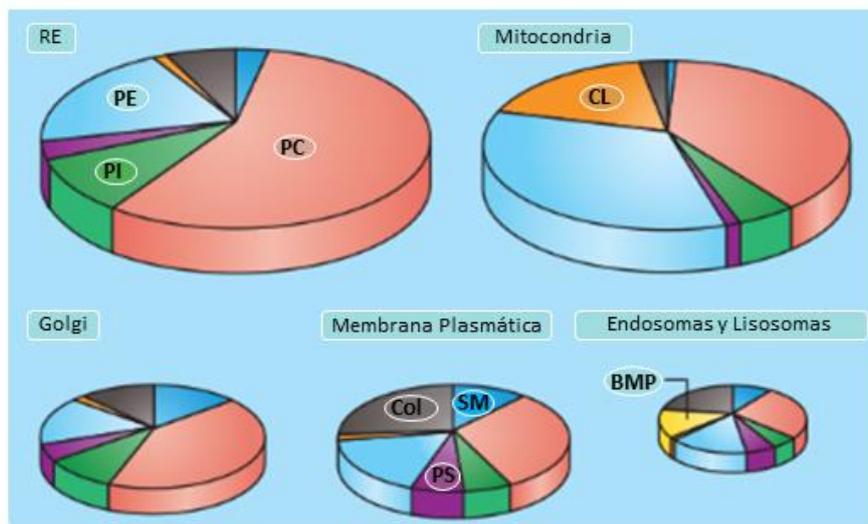


Figura 3. Distribución de lípidos en las células eucariotas. BMP: ácido lisobifosfatídico, CL: cardiolipina, Col: colesterol. Extraído de van Meer et al., 2011.

En resumen, la composición lipídica de las organelas celulares se adapta a sus tareas especializadas. Las membranas intracelulares muestran una transición fundamental en su composición lipídica dividiendo la vía secretora en territorios de membranas tempranas y tardías, lo que permite a la célula compatibilizar las funciones biogénicas con las de barrera (Fig. 2). A los fines de mantener las características contrastantes de estos territorios de la erosión generada por el tráfico vesicular las células evolucionaron incorporando una red de sensores de composición lipídica y tuberías a lo largo de la cual los lípidos se mueven por **mecanismos no vesiculares** (Holthuis et al., 2014).

1.2. Transporte intracelular de lípidos: rol de las proteínas transportadoras de lípidos

Los lípidos sintetizados en el RE son transportados a las diferentes membranas celulares u organelas, a través de mecanismos de transporte vesicular o no vesicular (Lev, 2010, 2012) (Fig. 4).

El transporte vesicular de lípidos, en oposición al no vesicular, requiere energía metabólica, un citoesqueleto intacto y la conexión con la maquinaria de transporte vesicular. En cambio, en el transporte de lípidos no vesicular un monómero de lípido difunde a través de la membrana donora a otra aceptora. Dado que la mayoría de los lípidos celulares son altamente hidrofóbicos, su difusión a través de una fase acuosa es muy lenta e insuficiente para sostener el transporte (Mesmin et al., 2009). Sin embargo, el transporte espontáneo de los lípidos se puede facilitar, en gran medida, por medio de los denominados “sitios de contacto de membranas” (SCM) y a través de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) (Lev, 2010, 2012).

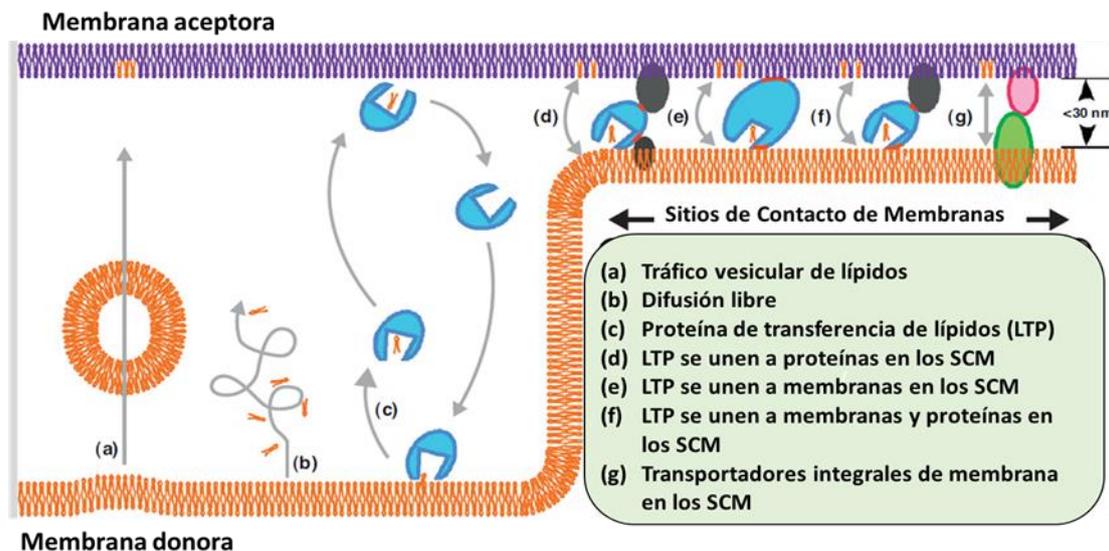


Figura 4. El intercambio de lípidos entre compartimentos celulares se produce por mecanismos vesiculares (a) y no-vesiculares (b – g). Uno de los mecanismos de transferencia de lípidos no vesicular entre las membranas es la transferencia espontánea de los monómeros de lípidos (b). Otro intercambio de lípidos no vesicular requiere de proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) (c). Hay cinco grandes familias de LTPs y la mayoría de las células expresan muchas de ellas. Las LTPs unen solo una molécula lipídica en un túnel hidrofóbico o hendidura y pueden transportarla entre las membranas. Las LTPs pueden actuar en los sitios de contacto de membranas (SCM) (d)–(f). Algunos intercambios de lípidos en SCM no parecen requerir LTPs pero en cambio pueden estar mediados por transportadores integrales de membrana (g). Extraído de Toulmay et al., 2011.

El movimiento de lípidos intramembranas (*"flip-flop"*), es producido por las flipasas que estabilizan la asimetría de la transbicapa, para que el grupo polar de los fosfolípidos pase fácilmente a través del interior de la membrana hidrofóbica. Por ejemplo, la activación de la 'escramblasa' permite el intercambio de lípidos entre las bicapas y expone PS sobre la superficie celular. Esto ocurre en la apoptosis, donde PS es reconocida por un receptor y la célula apoptótica sufre fagocitosis. Las flipasas también generan la curvatura de la membrana, facilitando la gemación de vesículas en el transporte del RE al Golgi.

Cada región de la membrana del trans-Golgi contiene P4-ATPasas, miembros de la familia de transporte tipo catiónico P-ATPasas, que translocan los aminofosfolípidos PS y PE hacia la hemicapa citosólica de la membrana. Por otro lado, los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) mueven los lípidos desde la hemicapa citosólica, utilizando el mecanismo de una flipasa inversa ('floppase'). En la mayoría de los casos, los transportadores ABC exterioriza el sustrato lipídico hacia aceptores fuera de la membrana (van Meer et al., 2008; Leventis et al., 2010).

Por otro lado, el transporte no vesicular de lípidos intermembranas ocurre fundamentalmente facilitado por las LTPs que pueden llevar un monómero de lípidos en un bolsillo hidrofóbico y transferirlo entre membranas a través de una fase acuosa. Las LTPs se han identificado en eucariotas, plantas y en bacterias, y de acuerdo a su similitud de secuencia se han subdividido en diferentes familias de proteínas denominadas **OSB** (*Oxysterol-binding protein*)/**ORP** (*OSBP-related proteins*), **PITP** (*Phosphatidylinositol transfer protein*), proteínas con el dominio **CRAL/TRIO**, **GLTP** (*Glycolipid transfer protein*), **SCP** (*Sterol carrier proteins*) y **START** (*steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer*) (Holthuis et al., 2005) (Fig. 5).

En general, las LTPs tienen especificidad para uno o más tipos de lípidos, y pueden contener sólo el dominio de transferencia de lípido, o dominios estructurales adicionales con diferentes funciones. Pueden existir en dos conformaciones diferentes: una conformación "cerrada", lo que refleja una conformación de transporte competente, donde una molécula lipídica está encerrada en la cavidad y una conformación "abierta" unida a la membrana (Wirtz, 2006; Wirtz et al., 2006). Muchas LTPs poseen motivos específicos de interacción con la membrana tales como el motivo FFAT que se acopla a receptores del RE, y un dominio PH que une fosfatidilinositol-4-fosfato. La presencia de estos motivos asegura una mayor

frecuencia de encuentros productivos entre las LTPs y membranas particulares, asegurando la especificidad de transporte (Holthuis et al., 2014).

El tipo de lípidos y su concentración en la superficie así como parámetros adicionales, incluyendo la composición lipídica de las membranas donora y aceptora, su carga, la curvatura, el tamaño y la fluidez, influyen el transporte de lípidos mediado por las LTPs. El tiempo de difusión a través de la LTP en el citosol se correlaciona con la distancia entre las membranas donoras-aceptoras y podría reducirse en gran medida si las dos membranas se encontraran en estrecha aposición una a la otra en los SCM (Lev, 2010, 2012).

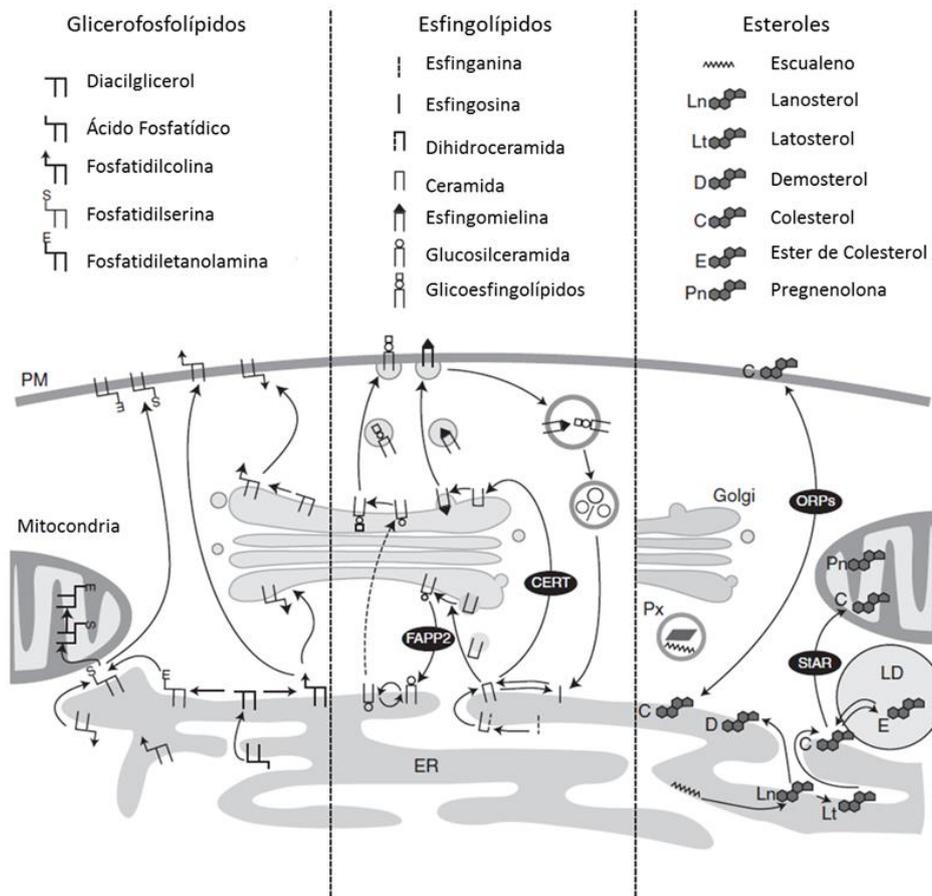


Figura 5. Tráfico de lípidos entre las principales membranas. (Izquierda) los glicerofosfolípidos son sintetizados en el RE y su transporte exocítico es por mecanismos no vesicular, pobremente caracterizado. La síntesis *de novo* de esfingolípidos se inicia en el RE. El transporte de ceramida del RE al Golgi para la formación de esfingolípidos más complejos es mediado por la proteína CERT y en menor medida por transporte de membrana. El transporte post-Golgi de esfingolípidos complejos depende de transporte de membrana. Esfingosina que proviene de esfingolípidos complejos degradados lisosomalmente puede ser acilada formando ceramida en el RE y reciclada a SM y glicoesfingolípidos. (Derecha) las enzimas biosintéticas de colesterol residen en el RE, y algunas enzimas también están localizadas en peroxisomas (Px). Los esteroides son transportados en gran medida a través del Golgi y las proteínas ORP desempeñan un papel importante en este proceso. Los esteroides importados en las mitocondrias por StAR pueden utilizarse para la síntesis de hormonas esteroideas. Las flechas indican la dirección del transporte de lípidos. Las proteínas transportadoras están indicadas por círculos negros. Extraído de Blom et al., 2011.

1.3. Los lípidos como mensajeros primarios y secundarios

Las células utilizan vías de señalización específicas mediadas por lípidos para diferentes fines, por ejemplo, varios gliceroesfingolípidos son blanco de toxinas, virus, bacterias y parásitos. Un importante sistema regulador incluye quinasas y fosfatasa lipídicas que proporcionan derivados únicos de PI que son fosforilados en una, dos o tres posiciones del anillo de inositol, formando los fosfoinosítidos. Se encuentran mayores concentraciones de fosfatidilinositol-4-fosfato en el aparato de Golgi, fosfatidilinositol 3-fosfato en endosomas y fosfatidilinositol (4,5) - bisfosfato en las membranas plasmáticas. Los mismos reclutan, en la superficie citosólica, proteínas efectoras específicas de organelas para el transporte vesicular y transducción de señales, mientras que en la matriz nuclear forman parte de los complejos proteicos de señalización (Barlow et al., 2010; van Meer et al., 2011).

La ceramida y el diacilglicerol (DAG) son mensajeros secundarios producidos por fosfolipasas en la membrana plasmática que reclutan quinasas y fosfatasa citosólicas. Ambos son reguladores de la apoptosis y el transporte a través del Golgi. Los lisofosfolípidos, ácidos grasos, DAG y ácido fosfatídico productos de la acción de las fosfolipasas A2, C y D, participan en la gemación y fusión de membranas en el aparato de Golgi y probablemente en otras organelas. Los lípidos solubles en agua como la esfingosina-1-fosfato (S1P) y ácido lisofosfatídico (LPA) son secretados por las células a través de transportadores ABC y posteriormente activan receptores localizados en la superficie celular (Takabe et al., 2008). Están involucrados en múltiples aspectos de la proliferación celular y la diferenciación (van Meer et al., 2011). El ácido araquidónico, sus derivados y los oxisteroles activan receptores nucleares que afectan la transcripción. Finalmente, las células también emplean sistemas de sensores y efectores para regular la composición lipídica de sus membranas. Un ejemplo es el sistema de la *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) (Radhakrishnan et al., 2008).

SECCIÓN 2

LA FAMILIA DE PROTEÍNAS START

La familia de proteínas con dominio START, son LTPs involucradas en el transporte de lípidos no vesicular. Poseen un dominio START de 210 aminoácidos que une lípidos, cuya estructura tridimensional se define por una cavidad hidrofóbica que puede acomodar una molécula de lípido y sirve así como un "puente hidrofóbico" entre la membrana donora y la aceptora. En algunas proteínas el dominio START puede actuar como un sensor de lípidos más que como transportador. Las proteínas con dominio START tienen diversas especificidades lipídicas y localizaciones subcelulares lo que explica su rol específico en el sentido /transporte de lípidos (Fig. 6).

Las proteínas START actúan en una variedad de procesos fisiológicos, tales como transferencia de lípidos entre los compartimientos intracelulares, el metabolismo lipídico y modulación en los eventos de señalización. La mutación o expresión desregulada de las proteínas START está vinculada a procesos patológicos, incluyendo enfermedades genéticas, enfermedades autoinmunes y cáncer. Además del dominio START común, que siempre se encuentra en el extremo carboxiterminal en los mamíferos, la mayoría de las proteínas START poseen dominios adicionales que favorecen el intercambio de lípidos. Existen evidencias que estos dominios adicionales podrían ser capaces de crear SCM entre diferentes organelas favoreciendo el intercambio de lípidos a través del dominio START (Alpy et al., 2014).

2.1 Diversidad de la familia de proteínas con dominio START

En humanos, 15 proteínas diferentes poseen el dominio START. Basado en la homología de secuencia del dominio START, el ligando lipídico y funciones similares, estas proteínas han sido agrupadas en 6 subfamilias (Fig. 6).

	Nombre	Estructura Proteica	Localización subcelular	Expresión
Unidos a Organelas Transportadores de Esteroles	StarD1/StAR		Mitocondria	Células esteroideogénicas (gónadas, adrenales)
	StarD3/MLN64		Endosomas tardíos	Ubicua
	StarD4		Citoplasma, RE	Ubicua
	StarD5		Citoplasma	Ubicua
Solo- START Transportadores de Esteroles	StarD6		Citoplasma	Ubicua
	PC StarD2/PCTP		Citoplasma, mitocondria	Ubicua
	PC StarD7		Citoplasma, mitocondria	Ubicua
	PC, PE StarD10		Citoplasma	Ubicua
Esfingolípidos/ Glicolípidos	Cer. StarD11/CERT		RE, Golgi	Ubicua
RhoGAP-START ?	StarD12/DLC-1		Adhesiones Focales	Ubicua
	StarD13/DLC-2		Adhesiones Focales	Ubicua
	StarD8		Adhesiones Focales	Ubicua
Tioesterasa -START	StarD14/BFIT		Mitocondria	Ubicua
	StarD15/CACH		Citoplasma	Hígado
?	StarD9		Centrosoma	Ubicua

Figura 6. Estructura de la familia de proteínas START. La familia de proteínas START se divide en subfamilias basadas en la homología de secuencia del dominio START. Mt: señal de localización mitocondrial; MENTAL: *MLN64 N-terminal domain*; PH: *pleckstrin homology*; FFAT: dos regiones ácidas de fenilalaninas; THIO: plegamiento *hotdog* dominio acil-CoA tioesterasa; SAM, *sterile alpha motif*; RHO GAP: proteína activadora de GTPasa; KMD: dominio motor de kinesina, FHD: FHA dominio de unión de fosfoproteínas. Extraído de Alpy et al., 2014.

2.2. Subfamilia StarD1/StAR

Este grupo incluye a dos miembros, StarD1 (StAR), el modelo de la familia START, y StarD3 (MLN64). Las proteínas StarD1/D3 son similares en el dominio START, el cual sólo une colesterol. Tienen propiedades bioquímicas idénticas de unión y transferencia del lípido

(Arakane et al., 1997), pero difieren en su parte amino-terminal, ya que StarD1 posee una señal que la direcciona a la mitocondria, mientras que StarD3 tiene un dominio de anclaje a la membrana, el dominio MENTAL (Alpy et al., 2005). La localización subcelular diferencial de estas proteínas sugiere diferentes funciones en el tráfico de colesterol. En efecto, StarD1 es una proteína mitocondrial expresada fundamentalmente en gónadas y glándulas suprarrenales, mientras que StarD3, se expresa ubicuamente anclada a la membrana de los endosomas tardíos (Alpy et al., 2001).

StarD1/StAR fue descrita por primera vez como una proteína de 30 kDa inducida por la estimulación de la hormona trópica en la corteza suprarrenal de rata y en sistemas de cultivos celulares (Krueger et al., 1983). Es una fosfoproteína que se sintetiza en el citosol como una proteína precursora de 37 kDa. Se importa a la mitocondria y es procesada en un producto intermedio de 32 kDa y uno maduro de 30 kDa que se localiza dentro de la matriz (Stocco, 2001). El incremento de la expresión StarD1 en la línea de macrófagos THP-1 disminuye los niveles totales de lípidos y colesterol, aumentando los niveles de ABCG1 y PPAR γ (Ning et al., 2009a; Ning et al., 2009b; Bai et al., 2010). Por otro lado, el silenciamiento de la expresión de la proteína mediante siRNA en HepG2 resultó en una disminución en el contenido de colesterol mitocondrial y aumento de la sensibilidad a agentes inductores de apoptosis (Clark, 2012).

De especial importancia fue el hallazgo de que las mutaciones en el gen hStarD1 son la base más común de la hiperplasia suprarrenal congénita lipoide (Fluck et al., 2011). Esta enfermedad se caracteriza por una falta total de síntesis de las hormonas esteroides que se acompaña por una acumulación patológica de colesterol en las *lipid droplets* dentro de las gónadas y las glándulas suprarrenales (Clark, 2012). Este fenotipo refleja la incapacidad de la proteína StarD1 mutante para transportar colesterol a través de las membranas mitocondriales y permitir su conversión en pregnenolona, el precursor de las hormonas esteroides (King et al., 2011).

StarD3/MLN64, al igual que StarD1, une específicamente colesterol. Se encuentra sobreexpresada en tumores malignos de mama en comparación con los benignos (Tomasetto et al., 1995). StarD3 podría funcionar en la esteroidogénesis en órganos que no expresan StarD1, como la placenta (Arakane et al., 1997). Sin embargo, ratones que carecen del dominio START parecen normales y no muestran defectos en la esteroidogénesis, haciendo esto poco probable (Kishida et al., 2004). Debido a la presencia del dominio START

y su localización en la membrana endosomal, se ha propuesto que StarD3 participa en la homeostasis del colesterol a través de la movilización del colesterol endosomal al aceptor citosólico o de membrana. El dominio MENTAL de StarD3 le permite anclarse a las membranas endosomales, dejando al dominio START C-terminal en el citoplasma (Alpy et al., 2001). Este dominio es un módulo de interacción proteína-proteína y al mismo tiempo unidor de colesterol (Alpy et al., 2005).

StarD3 tiene un papel potencial en la enfermedad de Niemann Pick Tipo C. Esta enfermedad es un trastorno de almacenamiento de lípidos causada por mutaciones que dan lugar a la acumulación de colesterol en orgánulos de almacenamiento lisosomal, que lleva a trastornos neurológicos y hepatoesplenomegalia (Rosenbaum et al., 2011; Clark, 2012).

2.3. Subfamilia StarD4

Este grupo está formado por las proteínas StarD4, StarD5, y StarD6. Estas tres proteínas unen colesterol e hidroxicolesterol. Las propiedades de unión de colesterol de StarD4/D5/D6 son sustancialmente idénticas a las de StarD1 y StarD3 (Alpy et al., 2009).

StarD4 transporta colesterol tanto a mitocondrias como al RE. La expresión heteróloga de StarD4 en células COS-1 o la adición de StarD4 recombinante a mitocondrias aisladas estimuló la transferencia de colesterol a las mitocondrias, aunque con menor eficiencia en relación con StarD1 (Soccio et al., 2005).

La proteína **StarD5** une específicamente colesterol y 25-hidroxicolesterol y no otros esteroides. Se encuentra sobreexpresada en cáncer de pulmón, hígado y riñón, localiza en las regiones perinuclear de la célula, pero no colocaliza con los marcadores de endosoma. Se ha observado, en macrófagos y en los túbulos renales proximales, una amplia distribución celular: citoplasma-membrana plasmática-Golgi-RE, (Rodríguez-Agudo et al., 2005; Rodríguez-Agudo et al., 2006; Rodríguez-Agudo et al., 2008; Chen et al., 2009).

Aunque StarD4 y D5 son expresadas en los mismos tejidos, sus genes son regulados diferencialmente, lo cual sugiere que tienen distintas funciones en el metabolismo del colesterol (Soccio et al., 2005); mientras que la expresión de StarD4 es inducida por proteínas reguladoras de unión a esteroides, la expresión de StarD5 incrementa por estrés de RE.

En contraste, la expresión de **StarD6** está restringida a testículo y se expresa en las células espermáticas pero no en las esteroideogénicas (Soccio et al., 2003; Gomes et al., 2005). Es importante el rol que juegan los lípidos y esteroides en la función del espermatozoide y la relación colesterol/fosfolípidos en la membrana plasmática disminuye durante la capacitación del mismo (Travis et al., 2002). También se ha demostrado expresión de StarD6 en el sistema nervioso de ratas expuestas a condiciones neurotóxicas (Chang et al., 2009).

2.4. Subfamilia StarD2/PCTP

El análisis filogenético agrupa a las proteínas StarD2/PCTP, StarD7, StarD10 y StarD11/CERT/GPBP. Este subgrupo es el más heterogéneo de todos, ya que los genes tienen una organización exónica distinta y dos de las proteínas que lo componen unen diferentes lípidos.

StarD2/PCTP (proteína transferidora de fosfatidilcolina) es una proteína citosólica específica de lípido que promueve el rápido intercambio de PC entre membranas (Wirtz, 1991). Se ha propuesto que PCTP transfiere PC desde su sitio de síntesis en el RE a la cara interna de la membrana plasmática y/o a la membrana externa de la mitocondria.

StarD7, también conocida como **GTT1** (*Gestational Trophoblastic Tumour 1*), es una proteína cuyo transcripto fue identificado en nuestro laboratorio sobreexpresado en coriocarcinoma (Durand et al., 2004). Ya que StarD7 es el eje de estudio de esta tesis, una descripción más detallada acerca de los avances en el conocimiento de la misma será desarrollada más adelante.

StarD10 (denominada en primera instancia como *PCTP-like*) se expresa constitutivamente en muchos órganos, incluyendo hígado, donde podría participar en la exportación de lípidos a la bilis. StarD10 une PC y PE (Olayioye et al., 2005). Su expresión es regulada durante el desarrollo del testículo y glándulas mamarias, y está concentrada en el flagelo de los espermatozoides (Yamanaka et al., 2000).

StarD11/CERT es una de las proteínas START mejor caracterizadas. Interviene en el transporte no vesicular de ceramida desde su sitio de síntesis en el RE al aparato de Golgi donde es convertida en SM (Hanada et al., 2003). Además, la ceramida transportada por CERT sirve como sustrato de la enzima glucosilceramida sintasa que sintetiza glucosilceramida en el Golgi (Halter et al., 2007). StarD11 puede transferir eficientemente

varias especies de ceramida con ácidos grasos de cadena larga (C14-C20) (Kumagai et al., 2005). Mientras que *in vitro*, la transferencia de ceramida de membranas donoras aceptoras sólo requiere el dominio START, *in vivo*, requiere la cooperación de varios módulos de la proteína, tales como el dominio PH y el motivo FFAT (Hanada et al., 2009).

2.5. Subfamilia RhoGAP-START

Este grupo está compuesto por tres proteínas: **StarD8** (DLC-3), **StarD12** (DLC-1) y **StarD13** (DLC-2) las que poseen una región SAM (motivo alfa estéril), un dominio Rho-GAP (proteína activadora Rho-GTP) y un dominio START (Durkin et al., 2007; Liao et al., 2008; Lukasik et al., 2011). La función del dominio SAM en estas proteínas no se entiende todavía completamente. Sin embargo, se reportó que el dominio SAM de StarD12 interactúa con el factor de elongación eucariota 1A1 (EF1A1), una proteína implicada en el control del crecimiento/muerte celular y de la red citoesquelética (Zhong et al., 2009). Esta interacción permite la localización eficiente de EF1A1 en la periferia de la membrana y frena la migración celular en una manera dependiente de Rho-GAP. Hasta ahora, la principal actividad biológica conocida de StarD8/D12 y D13 está mediada por su dominio Rho-GAP. Entre el dominio Rho-GAP y el START se encuentra una región desestructurada que es responsable de la localización de StarD8/D12 y D13 en las adhesiones focales (Kawai et al., 2004; Kawai et al., 2007; Kawai et al., 2009). Se demostró que esta región puede interactuar con el dominio SH2 de *C-terminal tensin like* y el dominio PTB de tensin1 y 2, que son proteínas residentes en adhesiones focales, explicando así la localización de StarD8/D12 y D13 en estas áreas especializadas de la membrana plasmática (Liao et al., 2007; Liao et al., 2008; Dai et al., 2011). Por lo tanto, las tres proteínas son muy similares en cuanto a estructura, localización celular y rol en el citoesqueleto de actina sugiriendo funciones redundantes. La ubicación subcelular específica de StarD8, D12 y D13 y sus capacidades para activar pequeñas proteínas de unión a GTP, desempeñan un papel central en diversos procesos biológicos tales como tráfico intracelular, adherencia, polaridad, motilidad y división celular, planteando la posibilidad de que actúen localmente para iniciar la regulación de cascadas de señalización de manera dependiente de la unión a lípidos.

2.6. Subfamilia de proteínas START con dominios tioesterasa

Este grupo se compone de dos proteínas, StarD14 y StarD15 y es parte de la familia de acil-CoA tioesterasas (ACOT) responsable de hidrolizar las moléculas de acil-CoA. La presencia del dominio START distingue a StarD14 y D15 de otras proteínas ACOT. De hecho, StarD14 (ACOT11/BFIT/Them1) y StarD15 (ACOT12/CACH) poseen dos dominios *thioesterase hot-dog* (THIO) asociados a un dominio START (Kirkby et al., 2010). El ligando de los dominios START de StarD14 y StarD15 es desconocido aunque estudios cristalográficos indican que podría ser un ácido graso (Thorsell et al., 2011).

StarD14 hidroliza preferencialmente acil-CoAs de ácidos grasos de cadena larga y su forma activa es un dímero. El empalme alternativo genera dos isoformas de StarD14 con distintos dominios START carboxi-terminal (Adams et al., 2001). Sin embargo, la contribución exacta de estas variantes es incierta. Además, se demostró que el extremo amino terminal de StarD14 posee una señal de localización mitocondrial (Chen et al., 2012), sin embargo la actividad enzimática de StarD14 se encontró principalmente en el citosol y microsomas de tejidos de ratón (Han et al., 2012).

StarD15 se diferencia de StarD14 en la especificidad de sustrato, ya que actúa preferentemente sobre acetil-CoA. StarD15 se expresa principalmente en el hígado y es citoplasmática (Suematsu et al., 2006). A pesar de sus rasgos estructurales comunes, StarD14 y StarD15 tienen patrones de expresión, localización subcelular y especificidad de sustrato diferentes. La presencia del dominio START en estas enzimas sugiere que podría estar implicado en el suministro de sustratos al dominio catalítico THIO.

2.7. StarD9, único miembro de la subfamilia

StarD9 tiene características únicas: es una proteína grande de más de 500 kDa con una organización modular que consta de un dominio *kinesin* N-terminal, un dominio de fosfoproteína FHA y un dominio C-terminal START (Torres et al., 2011). Basada en la homología, StarD9 pertenece a la familia *kinesin-3* y por lo tanto también se llama Kif16a (Miki et al., 2005). Se demostró que StarD9 se asocia a los centrosomas y es crucial para la mitosis. De hecho, células depletadas de StarD9 muestran varios defectos en la mitosis, que finalmente conducen a la apoptosis. Se reportó que la inactivación de StarD9 sinergiza con taxol desencadenando la apoptosis, haciendo de esta proteína un potencial blanco

terapéutico en el tratamiento del cáncer (Torres et al., 2011). El rol del dominio START de StarD9 sugiere un vínculo entre los lípidos y la función del centrosoma.

2.8. Mecanismos moleculares de acción de las proteínas START

Se han descrito las estructuras tridimensionales de 8 de las 15 proteínas con dominio START (STARD1, D2, D3, D4, D5, D11, D13 y D14) (Kudo et al., 2008; Thorsell et al., 2011). Todos los dominios START muestran características estructurales similares con un plegamiento de hélice “*grip*” que consiste en una región central de 9 hojas β -anti-paralelas enlazadas por dos α hélices ($\alpha 1$ y $\alpha 4$). Dos lazos Ω ($\Omega 1$ y $\Omega 2$) se insertan entre las hojas $\beta 5/\beta 6$ y las hojas $\beta 7/\beta 8$, respectivamente. Esta estructura define una cavidad interna anfifílica lo suficientemente amplia como para dar cabida a una molécula de lípido (Tsujiyama et al., 2000).

La capacidad de las proteínas START para transportar lípidos sugiere que están preparadas para sentir las membranas blancas con el fin de recoger y entregar su ligando. Diferentes modelos apoyan la idea que dentro del dominio START hay elementos estructurales que orientan este dominio con respecto a la membrana biológica y asegura un posicionamiento favorable para el intercambio del ligando lipídico.

La actividad de transporte de lípidos mediada por las proteínas START probablemente se ve favorecida por la proximidad entre la membrana donora y aceptora. Estos SCM involucran predominantemente el contacto del RE con otras organelas (Levine et al., 2006; Toulmay et al., 2011). La participación de las proteínas START en los SCM mediada por el dominio START está apoyada por la caracterización de las proteínas StarD11 y StarD3 (Hanada et al., 2009).

Algunas proteínas de transferencia de lípidos tienen la capacidad de intercambiar dos especies de lípidos entre membranas (de Saint-Jean et al., 2011). Por ejemplo se demostró que StarD11 une DAG débilmente, un subproducto de la síntesis de SM; por lo tanto, se propuso que StarD11 transporta ceramida del RE al Golgi donde es metabolizado en SM y canjeado por DAG (Hanada, 2010).

2.9. Las proteínas START y el metabolismo de lípidos

El rol de las proteínas START en el transporte de lípidos intracelulares sugiere que tienen una función en el metabolismo lipídico. Se han generado varios modelos de ratón deficiente de proteínas START y se analizó su metabolismo lipídico. La mayoría de estos modelos de ratones deficientes muestran sólo leves defectos metabólicos con una modesta modificación del contenido en lípidos en algunos tejidos. Por ejemplo, ratones deficientes de StarD3 sólo muestran un ligero aumento en el almacenamiento de éster de esteroles cuando los animales son alimentados con una dieta alta en grasas (Kishida et al., 2004). En la misma línea, ratones hembras StarD4 *knock-out* simplemente muestran una moderada disminución de LDL y colesterol cuando son alimentados con una dieta de colesterol al 0.5% (Riegelhaupt et al., 2010) y los ratones StarD13 *-/-* son más delgados, con menos tejido adiposo que los ratones *wild type* (Yau et al., 2009). Estos datos sugieren la existencia de redundancia funcional en el transporte de lípidos mediado por la mayoría de las proteínas START, que probablemente es realizado por otras proteínas START del mismo grupo u otras proteínas de transferencia de lípidos como las proteínas Osh/ORP (Mesmin et al., 2013).

Para otras proteínas START, el fenotipo observado fue bastante sorprendente. StarD10 es una proteína de transferencia de fosfatidilcolina altamente expresada en el hígado. Ratones deficientes en StarD10 no muestran defectos en la secreción de PC en la bilis ni en el contenido de PC en el hígado (Ito et al., 2013). Por el contrario, segregan altas cantidades de ácidos biliares, principalmente conjugados con taurina. Además, el nivel de los ácidos biliares secundarios en el hígado de los ratones deficientes en StarD10 es menor con una mayor excreción fecal de ácidos biliares (Ito et al., 2013). Algunos reguladores del metabolismo de ácidos biliares, como PPAR α (*Peroxisome proliferator activated receptor alfa*) se ven afectados en el hígado de los ratones deficientes de StarD10, lo que sugiere que la pérdida de StarD10 modula la actividad de PPAR α .

De manera similar a StarD10, StarD2 transfiere PC *in vitro* y animales *knock-out* para StarD2 no muestran defectos en la secreción de PC en la bilis o en surfactante, dos fluidos biológicos altamente enriquecidos en este lípido (Kang et al., 2010). Sin embargo, se demostró la participación de StarD2 en la termogénesis adaptativa (Kang et al., 2009). De hecho, la expresión de StarD2 varía inversamente con la temperatura ambiental. Ratones deficientes en StarD2 son capaces de mantener la temperatura corporal aún en ambientes

fríos. La grasa parda de estos animales, el principal tejido implicado en la termogénesis, muestra células con mitocondrias agrandadas y alargadas. Esta modificación morfológica fue acompañada con un aumento de expresión de los genes termogénicos y mayor consumo de ácidos grasos (Scapa et al., 2008; Kang et al., 2009).

StarD14 es otra proteína involucrada en la regulación de la termogénesis. Se demostró que StarD2 interactúa con una acil-CoA tioesterasa (Kanno et al., 2007). Curiosamente estos dos dominios están presentes en la proteína StarD14. Esta asociación explica la similitud entre los fenotipos de ratones *knock-out* StarD2 y StarD14. Se demostró que ratones deficientes en StarD14 son viables y crecen normalmente (Zhang et al., 2012). A pesar de que el consumo de alimentos aumentó casi al doble son resistentes a la obesidad inducida por la dieta. Esto se explica por un gasto de energía mayor que se caracteriza por el consumo creciente de oxígeno y producción de calor. Estos datos sugieren que StarD14 funciona para disminuir el consumo de energía. Por lo tanto, StarD14 podría ser un blanco útil en el tratamiento del síndrome metabólico.

El rol fundamental de StarD11 en el transporte de ceramida fue confirmado en ratones deficientes (StarD11 $-/-$) los cuales mueren durante la embriogénesis alrededor de E11.5 como resultado de insuficiencia cardiovascular. En embriones deficientes en StarD11, el RE exhibe varias alteraciones morfológicas que se acompañan por la acumulación de ceramida y una disminución global del contenido de SM (Wang et al., 2009). Notablemente, las células también presentan alteraciones de las mitocondrias que pueden derivarse de una localización de ceramida en esta organela inducida por la ausencia de StarD11. Además, se ha demostrado que StarD11 está involucrada en las interacciones huésped-patógeno en células infectadas con la bacteria intracelular *Chlamidia trachomatis* suministrando ceramida a la bacteria (Elwell et al., 2011).

SECCIÓN 3

LA PROTEÍNA StarD7

3.1. Características estructurales y bioquímicas de StarD7

El gen StarD7 está ubicado en el brazo corto del cromosoma 2p12-2p11.2 y tiene 8 exones que abarcan 23,96 kb (Fig. 7). El ARNm de StarD7 (designado originalmente como GTT1, número de acceso a GeneBank AF270647.1) fue identificado en nuestro laboratorio, por técnicas de expresión diferencial de genes, con mayor expresión en la línea celular de coriocarcinoma JEG-3 que en las muestras trofoblásticas normales y benignas. El ARNm codifica una proteína de 295 aminoácidos (número de acceso AAF81750.1) con un peso molecular de aproximadamente 34,7 kDa y un pI de 5,79 (Durand et al., 2004). La secuencia de aminoácidos de StarD7 posee un 25% de identidad y 49% de similitud con la proteína de transferencia de fosfatidilcolina humana, bovina, y de ratón StarD2/PCTP (Cohen et al., 1999). Posteriormente, la secuencia de referencia del ARNm StarD7 (NM_020151.3) fue actualizada indicando que ésta codifica para una proteína de 370 aminoácidos (posiciones 402 a 1514) con un peso molecular teórico de 43,1 kDa y un pI de 9,04 (StarD7-I). Esta secuencia de ARNm tiene un segundo sitio putativo de inicio de la traducción (Codón AUG) localizado en la posición 627 que posiblemente codifique a la versión corta de la proteína. Esta isoforma de StarD7 (StarD7-II) se predice localizada en el citoplasma, mientras que StarD7-I contiene una región adicional de 75 aminoácidos la cual predice una putativa señal de localización mitocondrial.

Nuestro grupo de investigación reportó por primera vez la presencia de la proteína StarD7 en las células del trofoblasto humano, como una única proteína de aproximadamente 34 kDa (StarD7-II) (Angeletti et al., 2008). Adicionalmente, StarD7 fue detectada por espectrometría de masas y análisis de inmunotransferencia como una proteína de 35 kDa (Leman et al., 2009). Más recientemente, Horibata y col., utilizando extractos proteicos preparados a partir de células transfectadas con un vector de expresión que codifica a StarD7-I observaron, mediante *western blot*, dos proteínas con pesos moleculares de 43 kDa y 33 kDa (Horibata et al., 2010). Estos autores proponen que StarD7 se sintetiza como una proteína precursora de 43 kDa que se procesa, por escisión de la secuencia mitocondrial, a una forma madura de aproximadamente 33 kDa. Además, observaron que StarD7-I

sobreexpresada en células de hepatoma de ratones HEPA-1 y cultivados a baja densidad celular se localiza principalmente en mitocondria, mientras que cuando estos cultivos se realizan a alta densidad celular StarD7 se ubica en el citoplasma. En contraste, StarD7-II sobreexpresada se distribuye siempre en el citoplasma cualquiera sea la densidad del cultivo celular. Sin embargo, el peso molecular de StarD7 endógeno detectado por estos autores fue de aproximadamente 33 kDa, coincidente con el peso molecular de la forma madura de StarD7-I y también StarD7-II (Horibata et al., 2010).

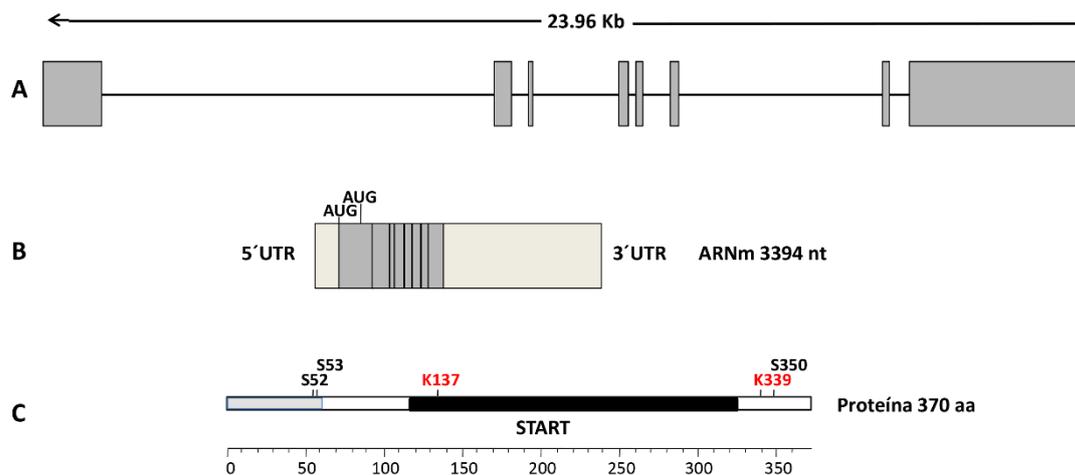


Figura 7. Representación esquemática del gen, del ARNm, y la proteína StarD7 humana. **A)** La representación lineal muestra la posición relativa y el tamaño aproximado de los ocho exones que abarcan 23,96 kb en el cromosoma 2. **B)** Esquema del ARNm (NM_020151.3) indicando los codones putativos de iniciación de la traducción AUG, que codifican a StarD7-I de 370 aa (posiciones 402-1514) y StarD7-II de 295 aa (posiciones 627-1514). Las regiones grises claras representan las regiones 5'UTR y 3'UTR. **C)** Se indica la proteína StarD7-I (370 aa), con los putativos sitios de ubiquitinación (rojo) y de fosforilación (negro), así como la señal de localización mitocondrial (rectángulo gris) y el dominio START (negro).

Dos sitios de ubiquitinación en las lisinas 137 y 339 de StarD7 (NP_064536.2) fueron identificados por captura por afinidad y espectrometría de masas (Kim et al., 2011). Además, se predicen tres sitios potenciales de fosforilación en las serinas 52, 53 y 350 (Hornbeck et al., 2012). Espectroscopía de dicroísmo circular/UV muestra que el espectro de StarD7 tiene un mínimo a 218 nm, que es típico de una conformación predominantemente de plegamiento β (Bose et al., 2008). Otras características estructurales secundarias indican que StarD7 no presenta similitud con las estructuras cristalinas conocidas de StarD3 y D4. Además, el agregado de StarD7 a mitocondrias aisladas de suprarrenales de cerdo no

modificó la síntesis de pregnenolona (Bose et al., 2008). Mediante el uso de una librería de péptidos se predijo que la secuencia situada entre los aminoácidos 152 y 167 de la proteína StarD7-II podría ser blanco de una proteína quinasa A (PKA), sugiriendo que StarD7 es una fosfoproteína regulada por la vía cAMP/PKA (Rodríguez et al., 2004). Finalmente, StarD7 fue identificada por análisis de espectrometría de masas en tándem, como una de las 139 proteínas candidatas que participan en las interacciones con el complejo de esclerosis tuberosa (Guo et al., 2010).

En resumen, los datos actuales apoyan la idea de que StarD7 se sintetiza como una proteína precursora de 43,1 kDa, de vida media corta, la cual se procesa a una proteína madura de 34,7 kDa que puede sufrir modificaciones postraduccionales que modulan su funcionalidad.

3.2. Interacción StarD7-lípidos

Varios estudios han demostrado que StarD7 interactúa, une, y transporta moléculas de lípidos. StarD7 es una proteína con alta actividad de superficie que forma monocapas estables por adsorción en la interfase aire-buffer (Angeletti et al., 2004). Experimentos biofísicos indicaron que StarD7 inyectada en la subfase de una solución, fácilmente penetró y difundió a monocapas de lípidos, evidenciado por un aumento en la presión de la superficie del sistema. La máxima presión superficial alcanzada varió según los lípidos presentes en la monocapa: alta para fosfatidilglicerol, dilaurilfosfatidilcolina, PS, y colesterol; intermedia para dipalmitoilfosfatidilcolina; y relativamente baja para SM. Estos hallazgos indican que la actividad superficial de StarD7 es lo suficientemente fuerte para dirigir y retener la proteína en la interfase lípidos-aire, donde puede sufrir una reorganización dependiente de lípidos, como se indica por los cambios en la presión superficial y electrostática de la interfase lipídica (Angeletti et al., 2004).

El mecanismo de interacción de StarD7 con la interfase membrana-lípidos ha sido dilucidado utilizando diferentes aproximaciones experimentales. Se demostró que StarD7 recombinante acelera el “*dequenching* de fluorescencia” de vesículas unilamelares pequeñas marcadas con 2-(4,4-difluoro-5, 7-dimetil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina en forma dependiente de la concentración empleada (Angeletti et al., 2011). Además, análisis de transferencia de energía de fluorescencia, de

distribución de tamaños de liposomas, y la formación de células gigantes multinucleares inducida por StarD7 recombinante, fuertemente indicaron que StarD7 favorece la fusión de bicapas. Este proceso se ve favorecido por PE, la cual estabiliza las fases no lamelares, que son consideradas estructuras intermedias en el proceso de fusión. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que StarD7 desempeña un papel importante en el tráfico intermembranas de lípidos mediante la promoción de la hemifusión de membranas (Angeletti et al., 2011).

Asimismo, nuestro grupo demostró por ensayos de unión *in vitro*, mediante ELISA, que la proteína StarD7 puede unir cardiolipina y PS pero no ceramida o fosfatidilinositol (resultados no publicados). Además, los ensayos basados en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia han demostrado que StarD7-I tiene una preferencia mayor para PC que para PS, PE, o SM (Horibata et al., 2010). Estos autores concluyeron que StarD7 facilita el transporte de PC a la mitocondria, y sugirieron que StarD7 extrae PC de las superficies citoplasmáticas del RE, aparato de Golgi, o membrana plasmática. Recientemente, Haberkant y col. demostraron, mediante ensayos de interacción *in vivo* de lípidos fotoactivables con proteínas, que StarD7 sólo interactúa con PC (Haberkant et al., 2013).

En consonancia con la capacidad transportadora de StarD7 y su asociación a membranas, nuestro grupo demostró que StarD7 se relocaliza parcialmente en la membrana plasmática durante la diferenciación *in vitro* de células citotrofoblásticas, sugiriendo que StarD7 participaría en la entrega de lípidos a la membrana plasmática (Angeletti et al., 2008). Más recientemente, se ha informado que PC puede ingresar o salir de *lipid droplets* en la célula por diversos mecanismos, uno de los cuales podría implicar las proteínas StarD2, D7 y D10 (Penno et al., 2012). Además del mecanismo de transporte no vesicular monomérico, las LTPs han sido implicadas en un mecanismo más eficiente de transporte promoviendo el intercambio de fosfolípidos entre el RE y otras organelas (por ejemplo, las mitocondrias, *lipid droplets*, endosomas, aparato de Golgi, la membrana plasmática) a regiones especializadas del RE llamados SMCs (Holthuis et al., 2005; Voelker, 2009; Horibata et al., 2010; Prinz, 2010). Sobre la base de estas observaciones y los resultados de Angeletti et al., se puede proponer que StarD7 contribuye al intercambio de lípidos intermembranas mediante la promoción de hemifusión transitoria (Angeletti et al., 2011). En conjunto, estas observaciones indican que StarD7, como miembro de las proteínas de dominio START, facilita el transporte no vesicular de lípidos entre las membranas.

3.3. Expresión de StarD7

Genes ortólogos a StarD7 humano se han anotado en las bases de datos GenBank y Ensembl en diferentes genomas, lo que sugiere una función fisiológica conservada.

La proteína StarD7 ha sido predicha en la mayoría de los filos animales, vertebrados e invertebrados, así como en plantas, lo que resalta su papel funcional.

Ensayos de RT-PCR semicuantitativa en una serie de líneas de células tumorales han demostrado que StarD7 tiene expresión generalizada, predominantemente en células derivadas de trofoblasto JEG-3, JAR, y HTR8/SVneo, células de carcinoma hepatocelular HepG2, de adenocarcinoma colorrectal HT29 y células Caco-2. Menores niveles de transcripción se observaron en las células de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa, células de adenocarcinoma de mama humana MCF7, células de adenocarcinoma de pulmón humanas A549, células de melanoma humano SK-MEL-31, células de leucemia mielocítica aguda humana K-562, y las células de leucemia promielocítica humana HL-60 (Durand et al., 2004).

Western blots y ensayos inmunohistoquímicos muestran que la proteína StarD7 está presente en citotrofoblastos (CTB) y sincitiotrofoblastos (STB) normales de placentas de primer trimestre y a término, en mola hidatiforme completa, y en tejido de coriocarcinoma, así como en las líneas celulares mencionadas anteriormente (Angeletti et al., 2008). Curiosamente, StarD7 es un gen blanco del miRNA (micro ARN de interferencia) Has-miR-377, que se encuentra disminuido en preeclampsia, lo que sugiere que la expresión de StarD7 puede estar alterada en esta patología (Zhu et al., 2009).

Varios análisis de expresión global de genes han demostrado que StarD7 se expresa en forma diferencial en diferentes células y tejidos sometidos a diversas condiciones experimentales tales como inflamación, cáncer, cambios en el estado metabólico y de comportamiento (Tabla I) (Flores-Martin et al., 2013).

En resumen estos estudios sugieren que los niveles del transcritto StarD7 están estrechamente controlados en la fisiología normal de la célula.

Tabla I. Expresión diferencial de StarD7 en células y tejidos.

Condición experimental	Estudio	Célula/Tejido	Niveles de Cambio	Expresión	Ref.
Cáncer	Carcinoma ductal <i>in situ</i> vs tejido normal	Células mioepiteliales	3	Aumentada	1
	Leucemia linfocítica crónica B vs células B normales	Células mononucleares de sangre periférica	>97	Aumentada	2
	Células microdisecadas de tumor	Tejido colorectal	2,59	Aumentada	3
	Células MA PaCa-2 transfectadas con mir-193b	Línea celular pancreática	2	Disminuida	4
	Células HCT-C18 tratadas con 5 fluoruracilo	Línea celular de cáncer de colon humano	2	Aumentada	5
Inflamación	Periodontitis crónica vs normal	Neutrófilos de sangre periférica	2,19	Aumentada	6
	Macrófagos convencionales M1 tratados con fosfolípidos oxidados	Macrófagos	3,02	Aumentada	7
	Neumonía por hipersensibilidad vs Fibrosis pulmonar idiopática	Pulmón	ND	Aumentada	8
	Miocardipatía dilatada idiopática vs no falla	Corazón	0,62	Disminuida	9
Estado Metabólico	Locus de carácter cuantitativo (QTL) en el cromosoma 2 asociado al crecimiento y la gordura	Hígado	1,17	Aumentada	10
	Ratones alimentados con dieta con alto contenido graso durante corto tiempo	Músculo esquelético	1,3	Aumentada	11
	Resistencia vs sensibilidad a la insulina	Tejido adiposo omental	0,28	Disminuida	12
	Ratones en ayuna	Intestino delgado	1,4	Aumentada	13
	Pinzamiento hiperinsulínico	Músculo esquelético	3,31	Aumentada	14
	Alargamiento vs acortamiento de la contracción	Biopsia del músculo de la pierna	2	Disminuida	15
Conducta	Miedo condicionado	Cerebro	ND	Aumentada	16
	Comportamiento del canto de los pájaros (cantan vs no cantan)	Núcleo vocal del proencéfalo, cerebro	DIH	Aumentada	17

ND: No determinado; DIH: detectada por hibridación *in situ*.

Referencias: **1.** (Polyak et al., 2005), **2.** (Jelinek et al., 2003), **3.** (Wiese et al., 2007), **4.** (Ikeda et al., 2011), **5.** (Xi et al., 2006), **6.** (Wright et al., 2008), **7.** (Kadl et al., 2010), **8.** (Selman et al., 2006), **9.** (Yung et al., 2004), **10.** (Jerez-Timaure et al., 2004), **11.** (de Wilde et al., 2008), **12.** (MacLaren et al., 2008), **13.** (Sokolovic et al., 2010), **14.** (Rome et al., 2003), **15.** (Kostek et al., 2007), **16.** (Park et al., 2011), **17.** (Wada et al., 2006) (Flores-Martin et al., 2013).

3.4. Regulación transcripcional de StarD7

3.4.1. Regulación de la expresión de StarD7 por β -catenina/TCF4

La primera evidencia de la regulación de StarD7 por β -catenina/TCF4 (*T Cell-Specific Transcription Factor 4*) fue dada por Lee et al. (Lee et al., 2007), quienes señalaron a StarD7 como un gen blanco de la vía de señalización dependiente de Wnt. La vía Wnt/ β -catenina es un mecanismo conservado de señalización entre células eucariotas, que regula la expresión génica a través del factor de transcripción TCF/LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) coordinando diferentes procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, y motilidad en el desarrollo celular normal así como en la progresión hacia un fenotipo tumoral (Fuerer et al., 2008).

Se ha reportado que la placenta humana así como diferentes líneas celulares trofoblásticas utilizadas como modelos de estudio, tal como JEG-3, expresan las proteínas que participan en la señalización mediada por Wnt, por lo que son capaces de enviar, recibir, e inhibir las señales de las proteínas Wnt. En línea con esto, numerosos informes han reportado que es importante la participación de la vía de señalización Wnt en la implantación, placentación y diferenciación del trofoblasto (Getsios et al., 2000; Hewitt et al., 2006; Pollheimer et al., 2006; Sonderegger et al., 2007; Wong et al., 2008; Fitzgerald et al., 2010; Sonderegger et al., 2010a; Sonderegger et al., 2010b). Componentes de la señalización Wnt parecen tener un papel importante en la captación, el transporte y el metabolismo de lípidos en la placenta, como también en la remodelación en la interfase materno-fetal. La desregulación de la señalización mediada por las proteínas Wnt se ha estudiado extensamente en varias enfermedades, incluyendo algunos trastornos angiogénicos (Nayeem et al., 2014).

En el laboratorio se demostró que β -catenina y TCF4 regulan la expresión de StarD7 interactuando con su región promotora. Por otra parte, la inactivación de GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) conduce a la estabilización de β -catenina y su translocación al núcleo, lo que resulta en un aumento de los niveles del ARNm y la proteína StarD7, así como el aumento de la actividad del promotor (Rena et al., 2010). Adicionalmente, mutaciones dirigidas al sitio de unión de TCF4 en la región promotora de StarD7 (situado entre las bases -614/-608 respecto al sitio de inicio de la transcripción) disminuyen notablemente su

actividad promotora. Es importante destacar que la interacción de TCF4 y β -catenina con el promotor de StarD7 humano ha sido confirmada *in vivo* mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). En resumen, estos estudios indican claramente que la señalización Wnt regula la transcripción de StarD7 en células JEG-3 a través de la vía canónica (Rena et al., 2010) (Fig. 8).

3.4.2. Regulación de la expresión de StarD7 por cAMP y el steroidogenic factor 1

Además del sitio de unión a TCF4, el cual es requerido para activar la expresión de StarD7 por β -catenina/TCF4 se han identificado en el promotor de StarD7 tres posibles motivos de unión para el receptor nuclear SF-1 (*steroidogenic factor 1*) (Morohashi et al., 1995). Éstos comprenden una secuencia en la región -792/-785 (CAAGGTCA, cadena superior) y otros dos potenciales sitios de unión en las secuencias -493/-486 (CAAGGACA, cadena superior) y -169/-162 (CTACCTTG, hebra inferior) respecto al sitio de inicio de la transcripción. Además, el análisis *in silico* de la región promotora sugiere la presencia de cuatro elementos de respuesta a cAMP (-510/-489, -235/-214, -160/-139, y -116/-96).

SF-1 es un miembro de la familia de receptores nucleares que desempeña múltiples funciones en el desarrollo y metabolismo. Este factor de transcripción, identificado en todos los tejidos esteroidogénicos, incluyendo la placenta, es requerido para la diferenciación de las glándulas endocrinas de mamíferos y para el desarrollo sexual (Parker et al., 2002; Lavoie et al., 2009). SF-1 participa en el control de la expresión de varios genes de respuesta a cAMP, tales como StarD1/StAR (Mulholland et al., 2005). En apoyo a esto, nuestro grupo demostró que la sobreexpresión de SF-1 y el agregado de cAMP a cultivos de células JEG-3 tuvieron efectos sinérgicos positivos en la actividad promotora de StarD7. El análisis de delección de la región promotora de StarD7 reveló que se requiere la región consenso de unión a SF-1 (-792/-785) para la inducción de la transcripción mediada por SF-1. Este efecto también se incrementa por la adición de *forskolin*, lo que sugiere la participación de la activación de PKA (Rena et al., 2011).

Ensayos de EMSA (*Electrophoretic mobility shift assays*) y análisis de competición, han demostrado que SF-1 se puede asociar con la región promotora de StarD7 principalmente a través del motivo SF-1 (-792/-785). Sin embargo, la interrupción de este sitio de unión condujo a una disminución de aproximadamente un 30% en la actividad

reportera de StarD7, lo que sugiere que SF-1 regula la expresión de StarD7 a través de otras interacciones con la región promotora (Morohashi et al., 1995).

3.4.3. *Cross-talk* entre β -Catenina/TCF4 y SF-1

Existen numerosas evidencias que demuestran que el receptor nuclear de hormonas esteroideas, SF-1 y la vía canónica Wnt interactúan a diferentes niveles para regular el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, y el potencial metastásico en diversos tejidos (Mulholland et al., 2005). β -catenina actúa como coactivador de SF-1 en la señalización mediada por Wnt de los promotores de los genes que codifican a Dax1 (Mizusaki et al., 2003), StarD1 (Mulholland et al., 2005; Roy et al., 2009), aromatasa (Parakh et al., 2006), GnRH receptor (Gardner et al., 2010), al receptor "*Müllerian inhibiting substance type II*" (Hossain et al., 2003), LHB/Lhb (Salisbury et al., 2008). En consonancia con esto, ensayos de CHIP y mutagénesis dirigida han demostrado que la activación de la expresión de StarD7 requiere la unión de β -catenina al factor de transcripción TCF4, lo que sugiere que β -catenina funciona como un puente entre SF-1 y TCF4 para formar un complejo ternario, que a su vez activa la expresión de StarD7 (Rena et al., 2011). Colectivamente, estos hallazgos indican que β -catenina actúa en conjunción con SF-1 para activar el promotor de StarD7 (Fig. 8). Las señalizaciones autócrinas y parácrinas de Wnt en combinación con SF-1 en la expresión de StarD7 puede tener importantes implicaciones en el metabolismo y el transporte de fosfolípidos, contribuyendo al desarrollo normal de las células trofoblásticas (Flores-Martin et al., 2013; Nayeem et al., 2014).

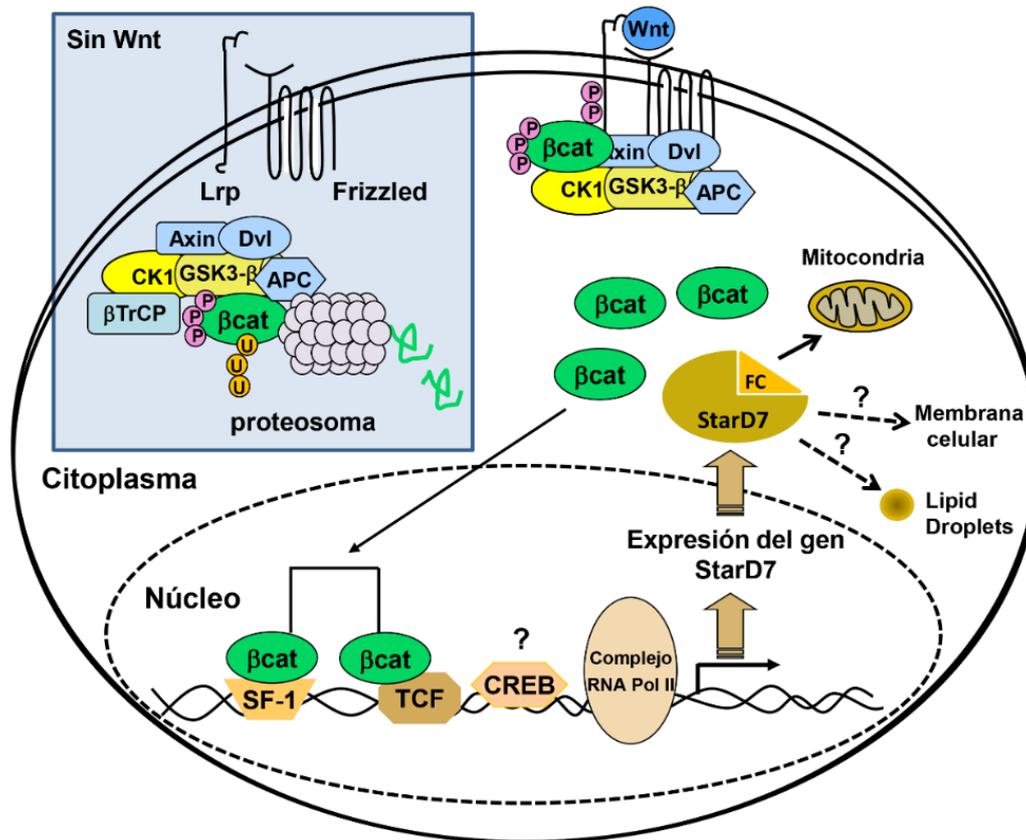


Figura 8. SF-1 (*Steroidogenic factor 1*)/β-catenina regulan positivamente la expresión de StarD7 en células JEG-3. El modelo propuesto muestra los mecanismos de SF-1/β-catenina implicados en la expresión inducida por StarD7. La vía Wnt/β-catenina es un mecanismo conservado de señalización en células eucariotas, que regula la expresión génica a través de la familia de factores TCF/LEF1 coordinando muchos procesos celulares. En ausencia de las proteínas Wnt, “el complejo de destrucción” formado por β-catenina-proteosoma permanece en el citoplasma, donde β-catenina se une, se fosforila, y ubiquitina a través de la proteína βTrCP. El proteosoma recicla el complejo degradando β-catenina (Sin Wnt). En presencia de señalización mediada por Wnt, se destruye el complejo de captura y se fosforila β-catenina pero se bloquea la ubiquitinación. Esto resulta en la acumulación y consecuente localización nuclear de la β-catenina recién sintetizada. En el núcleo, β-catenina regula la expresión de genes blanco mediante la interacción con el factor de transcripción TCF/LEF1 (Rena et al., 2011). β-catenina interacciona con SF-1 para aumentar la transcripción de StarD7 (Morohashi et al., 1995). Además, la proteína CREB (*cAMP response element-binding protein*) puede unirse a putativos elementos de respuesta de AMPc que modulan la expresión génica. StarD7 media el tráfico intracelular de fosfatidilcolina a la mitocondria (Horibata et al., 2010) y, posiblemente, a la membrana plasmática (Angeletti et al., 2008) y lipid droplets (Penno et al., 2012). APC (*adenomatous polyposis coli*); CK1 (*casein kinase 1*); Dvl, (*Dishevelled*); Lrp (*low density lipoprotein receptor-related protein*) (Flores-Martin et al., 2013).

SECCIÓN 4

METABOLISMO/TRANSPORTE LIPÍDICO Y HOMEOSTASIS CELULAR

Las células eucariotas superiores han desarrollado un sistema de endomembranas compartimentadas con el fin de aumentar la eficiencia y la diversidad de los procesos bioquímicos que deben realizar. Esta compartimentalización celular requiere de flujos de proteínas y lípidos interorganelas exquisitamente regulados que permitan asegurar y mantener la homeostasis celular. La interrupción y/o alteración de las vías específicas de transporte entre el RE, el complejo de Golgi, el sistema endosomal-lisosomal y la membrana plasmática, pueden tener consecuencias drásticas en la célula (Bexiga et al., 2013).

4.1. El Complejo de Golgi, el transporte vesicular y el metabolismo de lípidos

En general, la función del aparato de Golgi ha sido estudiada enfocándose en su participación en el transporte de proteínas, pero es a partir de una perspectiva centrada en los lípidos que permite tener una visión más amplia de la dinámica del tráfico de membranas (Bankaitis et al., 2012).

El aparato de Golgi juega un papel central en la biología de la célula eucariota. En estado de equilibrio, las membranas del Golgi se organizan normalmente en una pila de cisternas aplanadas donde se realizan modificaciones claves para la mayoría de las proteínas, incluyendo cambios en su perfil de glicosilación, sulfatación, fosforilación, y también la ruptura proteolítica (Bankaitis et al., 2012; Bexiga et al., 2013). El complejo de Golgi tiene como característica principal su *plasticidad*. Exhibe una notable capacidad para la autoorganización lo que le permite recuperarse de alteraciones estructurales catastróficas (por ejemplo, el colapso inducido por brefeldina A). Cambios morfológicos del aparato de Golgi interfieren con la modificación, clasificación y tráfico de las proteínas, como así también con procesos celulares más complejos, tales como la ciliogenesis, la polaridad y la migración celular, la respuestas al estrés y a la apoptosis (Bankaitis et al., 2012).

En su calidad de estación intermedia entre el RE y los compartimentos distales de la vía secretora, el aparato de Golgi organiza y mantiene los flujos bidireccionales de las vías de tráfico retrógrado y anterógrado. En los últimos años, se han identificado muchas

alteraciones de lípidos y proteínas que se asocian con el tráfico a través del complejo de Golgi, que causan enfermedades (Bexiga et al., 2013).

El metabolismo de lípidos está integralmente involucrado en el transporte y la función de Golgi, que a su vez, implica a varias proteínas y enzimas: proteínas de transferencia de lípidos, quinasas y fosfatasas, fosfolipasas D y A2, fosfolípidos acil-transferasas, y amino-fosfolípido flipasas que distribuyen los lípidos intra e intermembranas.

El metabolismo de los lípidos en primer lugar, ayuda a crear plataformas de reclutamiento y activación de proteínas en sitios apropiados de la superficie de la membrana del Golgi; en segundo lugar, facilita las deformaciones estructurales de las membranas que acompañan a la fusión y tubulación de las vesículas y tercero, efectúa una segregación lateral de moléculas contribuyendo a la función de Golgi (Bankaitis et al., 2012).

Se ha reportado que la inhibición de la síntesis de PC resulta en un transporte de proteínas alterado en el complejo de Golgi, que podría ser rescatado por la adición de PC exógena. Además se observaron cambios en los niveles intracelular de DAG cuando la síntesis de PC disminuye (Testerink et al., 2009; Sarri et al., 2011). DAG es un activador de las enzimas de la familia de la proteína quinasa C las cuales participan en varios procesos biológicos, tales como proliferación y diferenciación celular. DAG y ácido fosfatídico son necesarios para el transporte vesicular de las proteínas desde el Trans-Golgi (TGN), por lo tanto, se ha sugerido que la síntesis de PC está estrechamente relacionada con el mantenimiento del sistema de endomembranas, la proliferación y diferenciación celular (Testerink et al., 2009; Atila-Gokcumen et al., 2014).

Se ha demostrado que PITP es requerida para el tráfico retrógrado desde el Golgi hacia el RE, mediante las vesículas COPI. PITP es una proteína soluble de transferencia de lípidos que puede unirse e intercambiar PI y PC entre las membranas (Piao et al., 2012). Además, la disminución de la proteína de transferencia de PI, NIR2, modifica los niveles de DAG en el TGN a través de la vía CDP-colina provocando defectos en el transporte anterógrado y fragmentación del Golgi (Litvak et al., 2002; Carvou et al., 2010).

4.2. El retículo endoplásmico y la homeostasis lipídica

El RE es un compartimento integrado por una compleja red de membranas tubulares en donde tiene lugar la síntesis y exportación de proteínas, carbohidratos y lípidos. En el RE

se producen las modificaciones postraduccionales de las proteínas como la formación de enlaces disulfuro, la conjugación con moléculas lipídicas y la formación de glicoproteínas, entre otras, incluyendo el plegamiento y transporte de las proteínas. Es parte del sistema de defensa celular, contribuyendo mediante biotransformaciones específicas a la eliminación de productos erróneos, de diversos compuestos endobióticos y xenobióticos, incluyendo el metabolismo de fármacos. La mayoría de las reacciones de biotransformación se localizan en las membranas o en el compartimiento luminal del RE, donde intervienen enzimas y transportadores asociados a membrana (Mandl et al., 2013).

Como se mencionó, el RE es parte integral del sistema intracelular de endomembranas y proporciona los lípidos, particularmente PC, y las proteínas necesarias para la generación *de novo* de membranas, la homeostasis del colesterol y el almacenamiento y secreción de triacilglicerol. La coordinación de estos procesos biológicos es esencial, como lo demuestran reportes que asocian alteraciones en el metabolismo de fosfolípidos con perturbaciones en la respuesta de estrés, en el almacenamiento y secreción de lípidos, contribuyendo a patologías como obesidad, diabetes, arteriosclerosis y trastornos neurológicos (Testerink et al., 2009).

El RE es el principal sitio de síntesis de fosfolípidos, pero ésta no ocurre uniformemente a lo largo del RE sino que está localizada principalmente en los SCM con otras organelas y en las regiones de membranas dinámicas y proliferantes, coordinada con las actividades que ocurren en la membrana del aparato de Golgi, mitocondrias y plasmática (Fig. 9) (Lagace et al., 2013). Es importante señalar que es precisamente en estos SCM donde participan las LTPs transfiriendo lípidos por un mecanismo independiente del transporte vesicular a los fines de asegurar la homeostasis celular.

La PC es la principal especie de fosfolípido en las membranas de células eucariotas, que comprende aproximadamente el 50% de la masa total de fosfolípidos de la mayoría de las células y sus orgánulos. Una enzima importante que cataliza una etapa reguladora en la vía CDP-colina es *CTP:phosphocholine cytidylyltransferase* (CT). Esta enzima se localiza principalmente en el núcleo, citosol y RE. La inhibición de la síntesis de PC resulta en una perturbación de la estructura morfológica del RE, provocando además, una acumulación de *lipid droplets*, causado por un aumento de triacilglicerol intracelular (Lagace et al., 2013). Además, se ha demostrado que la inhibición de CT conduce a la inhibición del crecimiento celular y aumento de la apoptosis (Testerink et al., 2009).

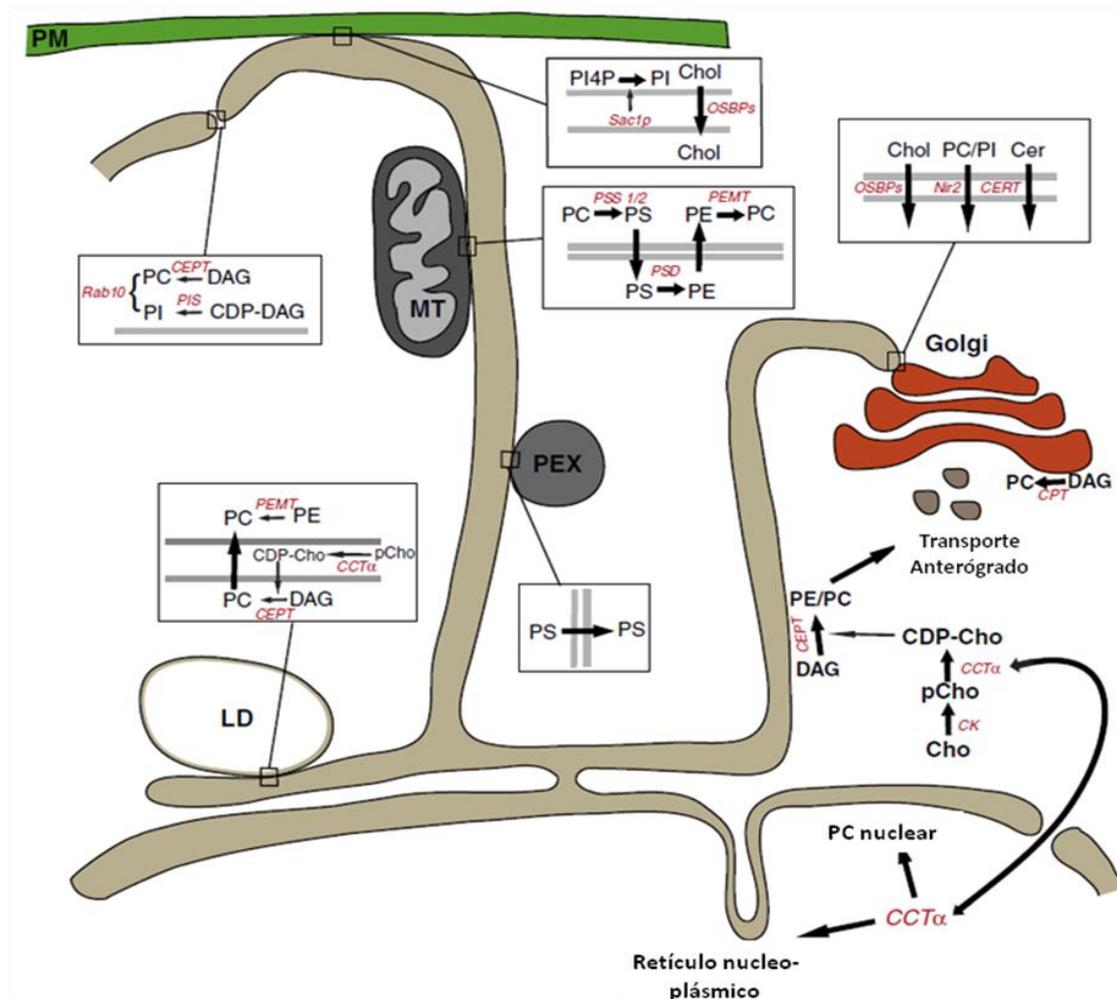


Figura 9. Localización del transporte y metabolismo de fosfolípidos en el RE y en los sitios de contacto. Las vías de transporte y metabolismo de fosfolípidos están específicamente localizadas en los sitios de contacto entre el RE y la mitocondria (MT), peroxisomas (PEX), membrana plasmática (PM), y el aparato de Golgi. Los contactos entre el RE-mitocondria y el RE-LD (*lipid droplets*) permite la reconstitución de los pasos biosintéticos por fusión y/o transporte de lípidos independiente del transporte vesicular. La localización diferencial de CCT α contribuye a las funciones nuclear vs. citoplasmáticas. *Ceramide transport protein*, CERT; colesterol, Chol; *phosphatidylinositol 4-phosphate*, PI4P; fosfocolina, PCho; *phosphatidylserine synthase I/II*, PSS1/2. Extraído de Lagace et al., 2013.

4.3. El estrés del retículo endoplásmico como respuesta a la desregulación lipídica

Disturbios en la homeostasis del RE, como alteraciones en el estado redox, los niveles de calcio o incapacidad para modificar post-traduccionalmente las proteínas, activan una respuesta que tiene por objetivo restaurar la homeostasis y el balance dentro del RE, proceso conocido como *Unfolded Protein Response* (UPR) o respuesta a proteínas mal plegadas (Fu et al., 2011). Fallos en esta respuesta pueden causar la acumulación de

proteínas anómalas en el interior del retículo lo que produce el llamado “estrés del retículo endoplásmico”.

La respuesta UPR se inicia cuando proteínas receptoras transmembrana residentes en el RE activan varias vías de transducción de señales, regulando la expresión de los genes que van a actuar en el proceso de reparación (Ron et al., 2007). Los tres principales sensores de estrés son las proteínas PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 (*inositol-requiring 1*) y ATF6 (*activating transcription factor 6*) (Fig. 10). Esta activación lleva a una reprogramación transcripcional de las células. Recientemente, se ha demostrado que los microRNAs (miRNAs) también participan en la UPR como reguladores claves de la homeostasis del RE. Se propuso que la maquinaria de biogénesis de miRNAs está regulada por el estrés del RE a través de una intrincada red de señalamiento confiriendo especificidad y selectividad a la UPR en forma dependiente del tejido o del estrés (Maurel et al., 2013).

Cuando el RE acumula proteínas mal plegadas o existe una perturbación en la homeostasis de los lípidos, las funciones de la UPR son: reducir la síntesis y mejorar el plegamiento de proteínas, aumentar la degradación de proteínas y ampliar el contenido de membranas del RE. Si estas respuestas no logran restablecer la homeostasis, la UPR puede desencadenar la muerte celular por apoptosis a través de la activación mediada por PERK, de la proteína pro-apoptótica CHOP (*C/EBP homologous protein*), o conducir a la formación de autofagosomas que incorporan estructuras del RE. Trabajos recientes muestran que la alteración de la homeostasis del RE, es un mecanismo común de diferentes enfermedades como la diabetes tipo 2, síndrome metabólico, retinitis pigmentosa, enfermedad de hígado graso no alcohólico, aterosclerosis, etc (Mandl et al., 2013).

Los cambios ambientales determinan la homeostasis del RE y modulan la UPR. Hay un complejo *cross talk* entre las vías de señalización internas y externas, los diferentes receptores de membrana plasmática y los sensores involucrados en la UPR. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis de PC conduce al estrés de RE, afectando el contenido de PC y por lo tanto la estructura del RE y su función. Se ha demostrado que una reducción del 50% de PC produce la transición de una estructura de RE tubular a esférica, ya que de esa manera se logra una mejor relación volumen/superficie, para poder preservar la integridad del orgánulo frente a la escasez del principal componente de la membrana. Como el RE es sensible a perturbaciones en su composición de lípidos así como a sus propiedades biofísicas, un desequilibrio entre fosfolípidos saturados e insaturados puede afectar la

actividad biogénica del RE induciendo una respuesta de estrés que puede desencadenar la muerte celular (Testerink et al., 2009).

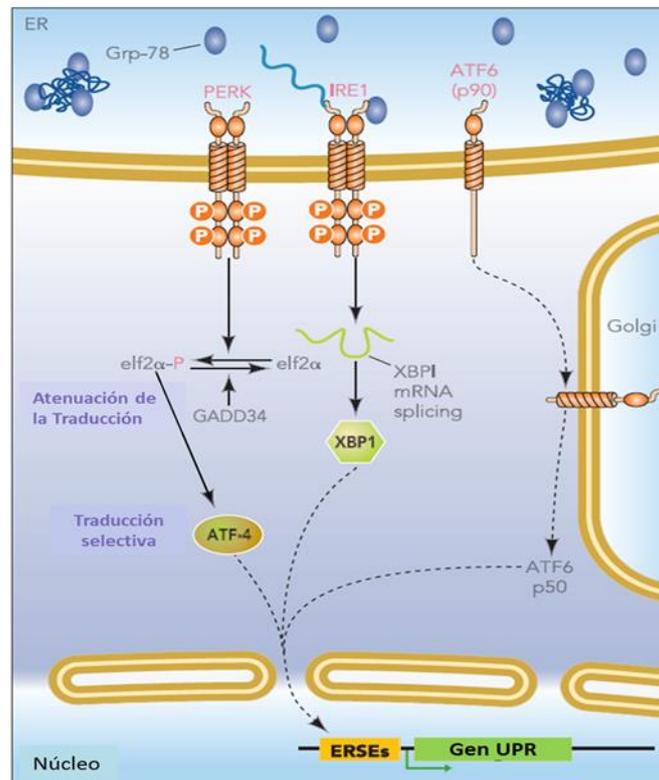


Figura 10. La UPR es mediada por tres proteínas de transmembrana residentes en el RE que sensan el estrés de RE. La quinasa PERK se activa por dimerización y fosforilación. Una vez activada, fosforila eIF2 α , resultando en la atenuación de la traducción. EIF2 α fosforilada selectivamente aumenta la traducción del factor de transcripción ATF4 que induce la expresión de genes blanco de UPR. La activación de IRE1 mediada por su dimerización y fosforilación causa el *splicing* del ARNm de XBP1. La traducción del ARNm de XBP1 produce un factor de transcripción que estimula los genes blanco a través de los promotores ERSEs. La activación de ATF6 implica translocación desde el RE al Golgi donde es procesado proteolíticamente para liberar un factor de transcripción de 50 kDa que se transloca al núcleo y se une a los promotores ERSEs de los genes blanco de la UPR. Las tres proteínas transmembrana residentes del RE sensan el estrés del RE a través de Grp78. La proteína GADD34, una proteína fosfatasa regulada por la vía PERK, desfosforila eIF2 α para restaurar la síntesis global de proteínas. Extraído de Lai et al., 2007.

La respuesta UPR activa la transcripción de genes de la biosíntesis de lípidos, entre otros, lo que permite la expansión de membranas para contrarrestar el estrés del RE ocasionado por el mal plegamiento de proteínas en su lumen (Mandl et al., 2013). Por lo tanto, las perturbaciones en la densidad de empaquetado de lípidos y la homeostasis del RE pueden tener importantes consecuencias fisiopatológicas. La regulación coordinada de la homeostasis lipídica, la homeostasis redox, el metabolismo de drogas y la señalización intracelular es un mecanismo adaptativo que puede responder a los cambios ambientales

(Fig. 11). Una mayor comprensión de los principios moleculares subyacentes podría revelar nuevas oportunidades para intervenciones terapéuticas en las enfermedades crónicas comunes como la obesidad y la resistencia a la insulina (Holthuis et al., 2014).

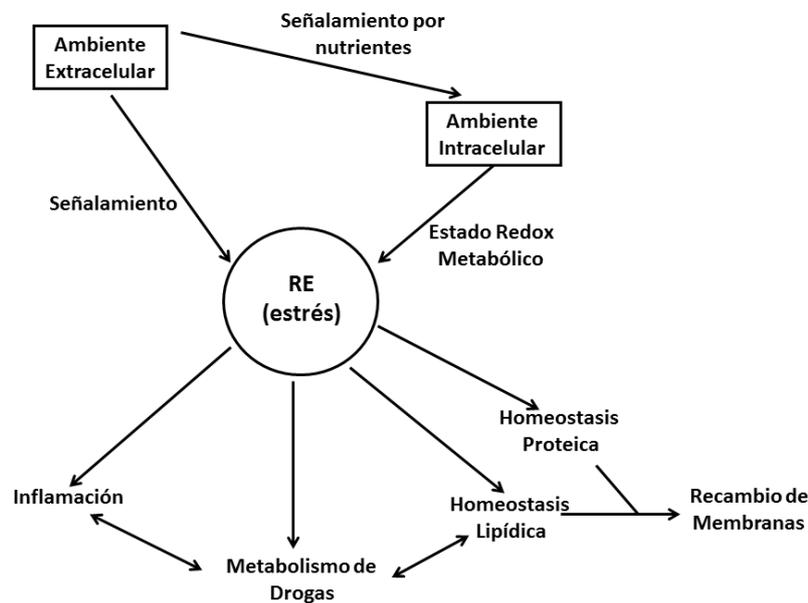


Figura 11. Factores que conducen a estrés del RE y las respuestas celulares el estrés genera. Se esquematizan los factores que causan estrés del RE en forma directa o indirectamente, desencadenando la respuesta UPR. Muchos de estos factores están conectados al desequilibrio redox. Extraído de Mandl et al., 2013.

4.4. La participación de los lípidos y las lipoproteínas de transferencia en la progresión tumoral

La activación del metabolismo de los lípidos es un evento temprano en la carcinogénesis y una característica central de muchos tumores (Hilvo et al., 2011; Santolla et al., 2012; Zhu et al., 2014). Al respecto, se demostró que varias enzimas y factores de transcripción que controlan la homeostasis lipídica y la lipogénesis están sobreexpresados en cáncer. Como se mencionó, numerosos reportes señalan que PC, el principal componente de los fosfolípidos de las membranas de las células eucariotas, así como metabolitos derivados de colina, contribuyen tanto a la proliferación como a la muerte celular programada (Atilla-Gokcumen et al., 2014). Los cambios en la disponibilidad de sustratos, como la alteración en proteínas que intervienen en el metabolismo y transporte de lípidos, contribuyen directa o indirectamente a un crecimiento maligno, reforzando el papel central de los fosfolípidos y sus metabolitos en la determinación del destino celular (Ridgway, 2013).

Un análisis del “metaboloma” de 60 líneas celulares derivadas de nueve tipos de tumores mostró que el consumo de glicina es una característica metabólica de las células cancerosas. Además se observó que la utilización de colina y la liberación de fosfocolina al medio está fuertemente correlacionada con la proliferación celular (Jain et al., 2012).

Por otro lado, numerosos estudios señalan la contribución que las LTPs realizan al establecimiento de la tumorigénesis. Entre las LTPs, la familia ORPs presenta un rol multifacético como sensores de esteroides y PIP en los SCM en las organelas, impactando en los mecanismos de regulación de la señalización de lípidos celulares, el transporte de vesículas, el metabolismo y la proliferación. Las funciones asignadas a las ORPs de mamíferos incluyen la coordinación del metabolismo de esteroides y esfingolípidos y el señalamiento mitogénico, la adhesión celular, la homeostasis lipídica en el macrófago, entre otras, participando en el control de la proliferación y la supervivencia celular (Oikkonen et al., 2013). Se demostró que el silenciamiento de todas las variantes de ORP4 conducen a un arresto del crecimiento pero no a la muerte celular (Charman et al., 2014). Recientemente, se ha reportado que la función y el metabolismo de los fosfoinositoides son controlados durante la tumorigénesis por una proteína específica de transferencia (Fayngerts et al., 2014).

Las proteínas START han sido también asociadas a cáncer. Por ejemplo, los cánceres de mama sobre-expresan el gen *HER2/erbB2* (un miembro de la familia del receptor EGF) junto con *StarD3* y *StarD10*. Los genes *StarD3* y *ErbB2* se ubican en el cromosoma 17q12-q21, una región amplificada con frecuencia en los cánceres de mama; esta proximidad y sus elementos reguladores idénticos en el promotor explican su co-expresión y cooperación en la transformación maligna (Alpy et al., 2014). De hecho, se demostró que la disminución de *StarD3* dificulta el crecimiento celular en líneas celulares que amplifican *ErbB2*. A su vez, *StarD10* coopera con *ErbB1* lo que sugiere un papel en el fenotipo canceroso. En línea con esto, *StarD10* fue identificada recientemente como un blanco de miR-661 durante la transición mesenquimal sugiriendo que la pérdida de expresión de *StarD10* podría ser una característica de tumores mesenquimales agresivos (Vetter et al., 2010; Alpy et al., 2014). Recientemente se observó asociación entre polimorfismos del gen *erbB2* y la expresión de *StarD3* en pacientes con riesgo de cáncer gástrico (Qiu et al., 2014). Por el contrario, algunos genes que codifican a proteínas con dominio START son inactivadas en cáncer. El gen *StarD12* originalmente llamado *deleted in liver cancer 1* (DLC-1) es un supresor tumoral

localizado en el cromosoma 8p21-22, una región que exhibe frecuente pérdida de heterocigosidad en cáncer. Este gen se pierde en algunos tumores primarios de hígado y de mama, con muy baja expresión en líneas celulares de tumores derivados de hígado, de mama, de colon y de próstata (Zimonjic et al., 2012).

Los otros dos miembros de la subfamilia Rho-GAP-START, StarD13 y StarD8 son también potenciales supresores de tumores. StarD13 está situado en 13q12.3, una región cromosómica con pérdida alélica frecuente en el carcinoma hepatocelular y otros tipos de cáncer. StarD8 también presenta una pérdida de expresión en ciertos tipos de cáncer y parece tener una función supresora de tumor. Se demostró que la actividad Rho-GTPasa contribuye a la iniciación y progresión del cáncer (Alpy et al., 2014).

Asimismo, se reportó que la proteína StarD11/CERT está implicada en cáncer. CERT puede modular la respuesta a señales apoptóticas inducidas por fármacos, cambiando el contenido de ceramida en células cancerosas. De hecho, se la ha implicado en los mecanismos de sensibilidad a los medicamentos utilizados en quimioterapia y en particular a paclitaxel, una molécula que inhibe la polimerización de los microtúbulos (Swanton et al., 2007; Lee et al., 2012).

Finalmente, como se detalla en la sección 3 (La proteína StarD7, pág. 27), StarD7 tiene alta expresión en líneas celulares tumorales. Varios estudios de expresión global de genes han reportado expresión incrementada de StarD7 en diferentes modelos de cáncer (Tabla I). Al respecto, nuestro grupo demostró que su promotor es regulado por la vía de señalización de Wnt canónica, comúnmente involucrada en la progresión tumoral (Rena et al., 2010).

Dado que la alteración de las LTPs es un evento común en una variedad de patologías incluyendo el cáncer, su modulación puede representar un nuevo blanco para las terapias (Alpy et al., 2014).

HIPÓTESIS

El transporte de lípidos y proteínas entre orgánulos es un evento crucial en la organización de los diferentes compartimentos celulares. Defectos en la cantidad, calidad, y distribución intracelular de lípidos se han asociado a un gran número de enfermedades humanas tales como enfermedad cardiovascular, obesidad, defectos metabólicos, preeclampsia, Alzheimer y cáncer (Prinz, 2010, Bexiga et al., 2013).

El transcripto StarD7, identificado en el laboratorio como un gen *up-regulado* en la línea celular JEG-3, codifica a una proteína que interactúa, une y transporta lípidos (Durand et al., 2004; Angeletti et al., 2008). StarD7 pertenece a la familia de proteínas con dominio START, las cuales actúan en una variedad de procesos fisiológicos, tales como transferencia, metabolismo lipídico y modulación en los eventos de señalización. Se ha demostrado que la mutación o expresión desregulada de las proteínas START está vinculada a procesos patológicos, incluyendo enfermedades genéticas, autoinmunes y cáncer (Alpy et al., 2005).

StarD7 es un gen ubicuo, con elevados niveles de expresión en varias líneas celulares epiteliales (Durand et al., 2004). Trabajos previos del laboratorio indican que su expresión es regulada por el señalamiento Wnt/ β -catenina a través de GSK3- β , vía que participa en la regulación de numerosos procesos celulares (Rena et al., 2009).

Considerando los antecedentes expuestos y el conocimiento acumulado en relación a las características estructurales de la proteína transportadora de lípidos StarD7 y de su promotor, así como la participación de los lípidos y otras LTPs en la homeostasis celular se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

“La proteína StarD7 es requerida para los eventos de proliferación, migración adhesión y diferenciación celular. Niveles alterados de la proteína StarD7 conducen a una desregulación en la homeostasis celular”.

OBJETIVOS

Para evaluar la hipótesis planteada y considerando que el transporte de lípidos entre organelas es un proceso esencial en la organización de los diferentes compartimientos celulares se propuso como:

Objetivo general:

Conocer la función de la proteína StarD7 y establecer la importancia de su expresión endógena en la fisiología celular.

Objetivos específicos:

✓ **Analizar el efecto del silenciamiento de StarD7 en la expresión de genes.**

Silenciar la proteína en estudio (StarD7), realizando en forma adicional un análisis de microarreglos de oligonucleótidos, permitirá estudiar la influencia de la misma frente a la expresión global de genes e identificar transcritos candidatos que puedan estar funcionalmente relacionados con StarD7.

✓ **Estudiar la participación de StarD7 en la homeostasis intracelular y en diferentes procesos celulares.**

Conociendo que proteínas de la familia START participan en el metabolismo, transporte y señalización lipídica, se determinará el impacto de la disminución de StarD7 en los procesos celulares esenciales como proliferación y diferenciación. Poder predecir las funciones que la proteína lleva a cabo, es fundamental para comprender su rol en la fisiología celular y en patologías a las que pudiera encontrarse asociada.

✓ **Identificar proteínas que interaccionan con StarD7.**

La determinación de putativas proteínas intracelulares asociadas a StarD7, ayudará a profundizar su caracterización a través de ensayos de inmunoprecipitación y espectrometría de masa.

RESULTADOS

I. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 EN LA EXPRESIÓN DE GENES

Con el fin de explorar la función que cumple StarD7 en la fisiología celular se evaluó, a nivel molecular y celular, el impacto que produce el silenciamiento de su expresión, para lo cual se realizaron ensayos de *knockdown* mediante siRNA (*small interfering RNA*).

Inicialmente se utilizó como modelo de estudio la línea celular JEG-3 derivada de coriocarcinoma (donde originariamente fue identificada StarD7). Para tal fin se utilizaron dos diferentes siRNAs dirigidos contra la secuencia del ARN mensajero de StarD7 (siD7.1 y siD7.2) y un siRNA *scrambled* como control negativo (siC) (Applied Biosystems/Ambion). El grado de silenciamiento se analizó mediante la valoración del transcrito de StarD7 a través de RT-PCR en tiempo real y los niveles de la proteína mediante *western blot* (utilizando un anticuerpo generado en el laboratorio). Se observó que ambos siRNAs produjeron una disminución significativa dependiente de la dosis, tanto en los niveles del transcrito de StarD7 (79% con siD7.1 y 60% con siD7.2), como de la proteína (83% con siD7.1 y 63% con siD7.2) a las 48 h de cultivo ($p < 0,01$) (Fig. 12 A y B).

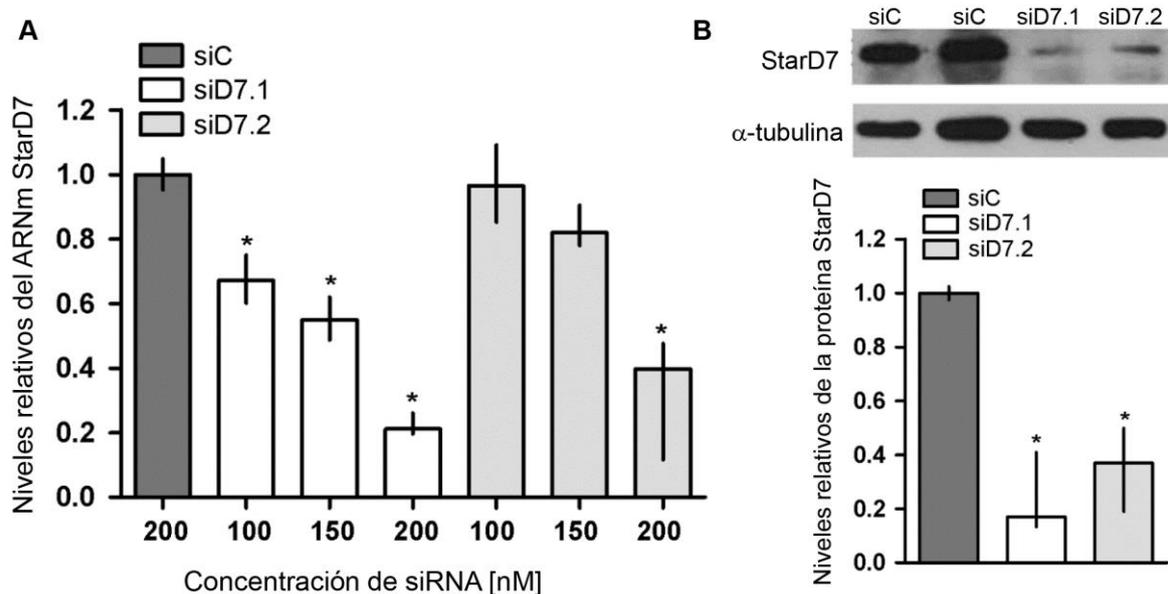


Figura 12. Efecto del silenciamiento de la expresión de StarD7 en células JEG-3 transfectedas durante 48 h con 100, 150 y 200 nM de siD7.1 y siD7.2. Se utilizó como control 200 nM de siC. **A)** La expresión del transcrito StarD7 se determinó mediante PCR en tiempo real. Se grafica: niveles relativos del transcrito StarD7 respecto al control (normalizados con ciclofilina A). **B)** Los niveles de proteína StarD7 se analizaron por *western blot*. En la parte superior se muestra un ensayo representativo y debajo la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de la proteína StarD7 respecto al control, normalizados con tubulina. Las barras indican la mediana y el rango intercuartiles * $p < 0,01$ ($n=3$).

Si bien siD7.1 demostró mayor eficiencia para disminuir la expresión endógena de StarD7, no se observaron diferencias significativas entre ambos siRNAs (siD7.1 o siD7.2). Los siguientes experimentos de silenciamiento se realizaron con siD7.1.

1.1. Ensayo de microarreglos de oligonucleótidos (*Microarrays*)

Con el fin de establecer si el silenciamiento de StarD7 afecta la expresión global de transcritos, se realizó un ensayo de *Microarray* utilizando ARN extraído de células JEG-3 transfectadas con 200 nM de siD7 o siC. Los resultados mostraron una alteración en la expresión de al menos 89 transcritos, observándose 46 ARN incrementados y 43 disminuidos, respecto a muestras tratadas con siC (nivel de corte ± 1.5) (Tabla II de Anexo). Los niveles de los siguientes transcritos diferencialmente expresados: Cnx43 (*Connexin 43*), TWIST1 (*Twist homolog 1*), MBD2 (*Methyl-CpG binding domain protein 2*), TGF β RII (*Transforming growth factor beta receptor II*), ABCG2 (*ATP-binding cassette, sub-family G member 2*), THSD7A (*Thrombospondin type I domain containing 7A*), SMURF2 (*SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2*), KDELC1 (*Lys-Asp-Glu-Leu containing 1*) y NID1 (*Nidogen-1*), algunos de los cuales son regulados al igual que StarD7 por la vía de señalamiento Wnt/ β catenina, fueron validados mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos fueron coincidentes con los observados mediante el análisis de microarreglos (Fig. 13).

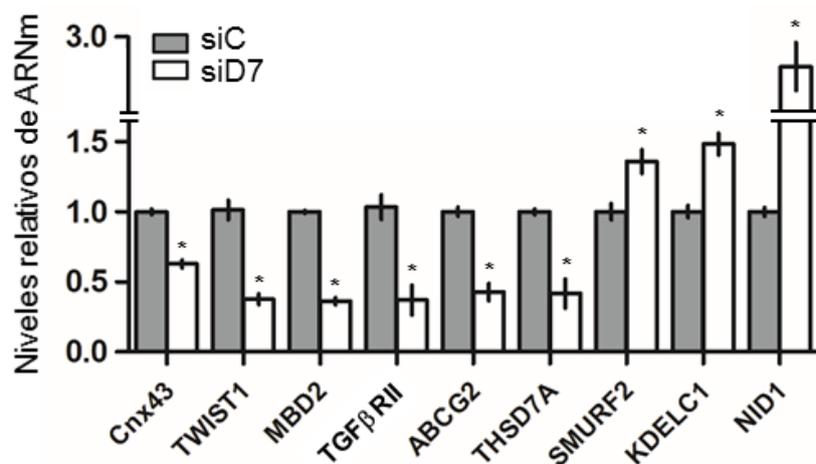


Figura 13. Expresión de ARNm de Cnx43, TWIST1, MBD2, TGF β RII, ABCG2, THSD7A, SMURF2, KDELC1 y NID1 diferencialmente expresados en la línea JEG-3 transfectada durante 48 h con 200 nM de siD7.1 o siC. Las barras indican niveles relativos de cada transcritos respecto al control (normalizados con ciclofilina A). Se grafica la mediana y el rango intercuartiles de tres experimentos independientes, * $p < 0,01$ (n=3).

1.2. Estudios relacionados al transportador de eflujo ABCG2

1.2.1. El silenciamiento de StarD7 reduce la expresión de ABCG2

Inicialmente el estudio se centró en el análisis del efecto del silenciamiento de StarD7 en la expresión del transcrito ABCG2.

La proteína ABCG2/BCRP (*ATP-binding cassette sub-family G member 2/Breast Cancer Resistance Protein*), es un miembro de la superfamilia de proteínas transportadoras ABC (Vasiliou et al., 2009; Kerr et al., 2011). Es una glicoproteína integral localizada en la región apical de la membrana plasmática y cumple un papel importante como transportador xenobiótico interaccionando con drogas quimioterapéuticas, además de transportar otros sustratos como PS y S1P (Woehlecke et al., 2003; Samadi et al., 2011). La proteína ABCG2 se encuentra altamente expresada en tejidos que forman barreras de protección incluyendo placenta, testículos, hígado, intestino, riñón, cerebro, entre otros (Stacy et al., 2013).

Como se mencionó, StarD7 es un gen ubicuo con elevados niveles de expresión en diferentes líneas celulares epiteliales (Durand et al., 2004). Por tal motivo y con el fin de extender los resultados del análisis de la expresión global de transcritos observados en la línea JEG-3 a otras células epiteliales, se silenciaron las siguientes líneas celulares: BeWo, derivada de coriocarcinoma; HTR8/SVneo, derivada de CTBs extravelloso humano; HepG2, derivada de hepatoma humano; HT-29, derivada de cáncer de colon humano y A549, de carcinoma pulmonar humano.

La eficiencia de silenciamiento obtenida con siD7 respecto a siC se muestra en la Figura 14. En todos los casos se obtuvo un nivel de silenciamiento superior al 70%, ya sea si analizamos el transcrito o la proteína StarD7. Se demostró, en todas las líneas celulares estudiadas, que la supresión de StarD7 produjo una significativa disminución tanto del transcrito (Fig. 14 A) como de la proteína ABCG2 (Fig. 14 B), observándose una mayor reducción en los niveles proteicos que en los ARNm.

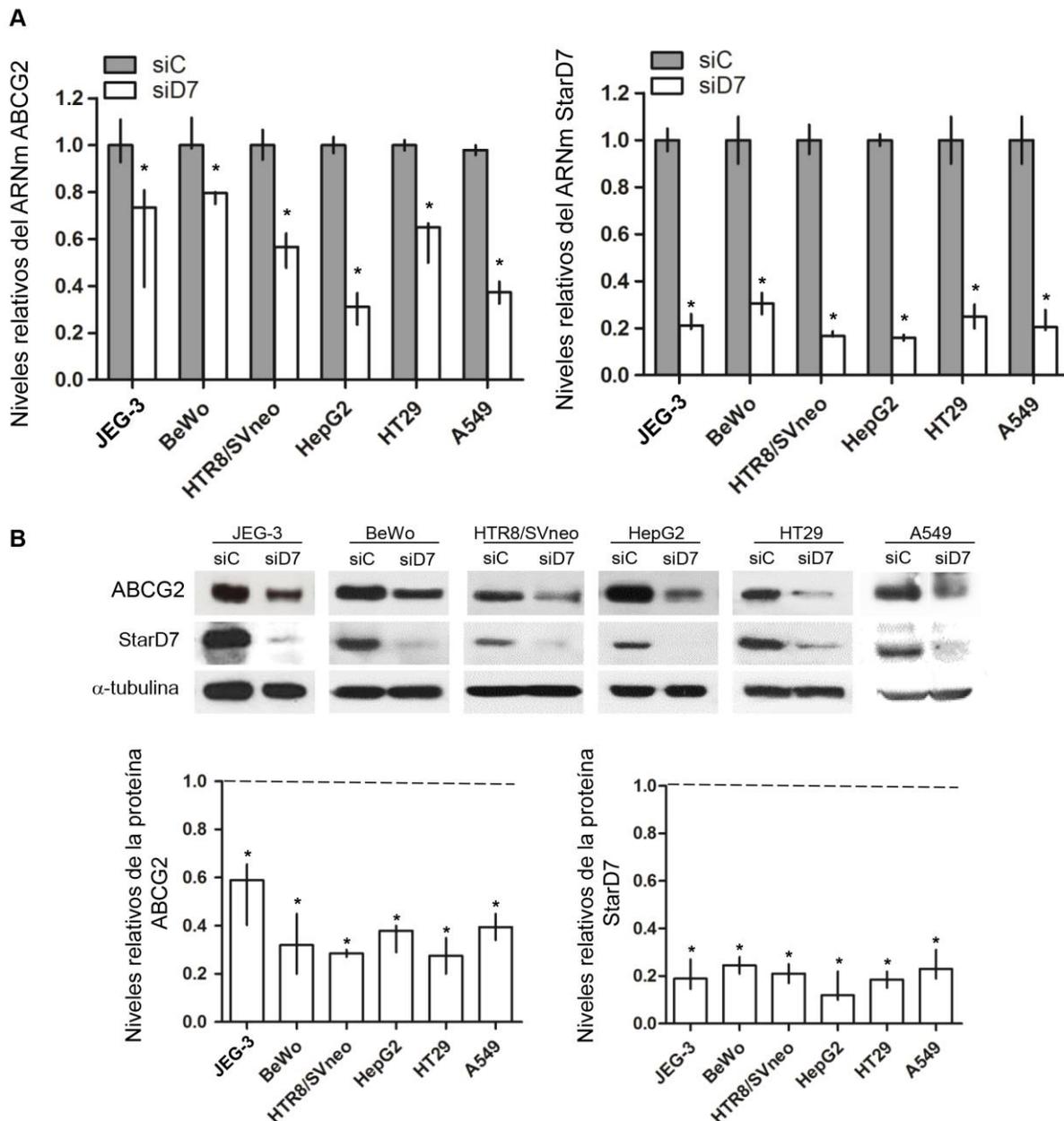


Figura 14. Expresión de ABCG2 y StarD7 en diferentes líneas celulares transfectadas durante 72 h con siD7 o siC. **A).** La expresión de los transcritos ABCG2 y StarD7 se analizó mediante PCR en tiempo real. El gráfico representa los niveles relativos del transcrito respecto al control (normalizados con ciclofilina A). **B)** Los niveles de las proteínas se midieron por ensayos de *western blot*. Arriba se muestran ensayos representativos para cada línea celular y abajo, la cuantificación densitométrica relativa de las proteínas ABCG2 y StarD7 en las células silenciadas de StarD7 respecto al control (siC=1), normalizados con tubulina (mediana y rango intercuartiles, de tres experimentos independientes, * $p < 0,01$).

Mediante ensayos de inmunofluorescencia se demostró una evidente supresión de la expresión citoplasmática de la proteína StarD7 (Fig. 15 B), que se acompañó con una clara

reducción de la proteína ABCG2 en la membrana plasmática en las células transfectadas con siD7 respecto al control (Fig. 15 A).

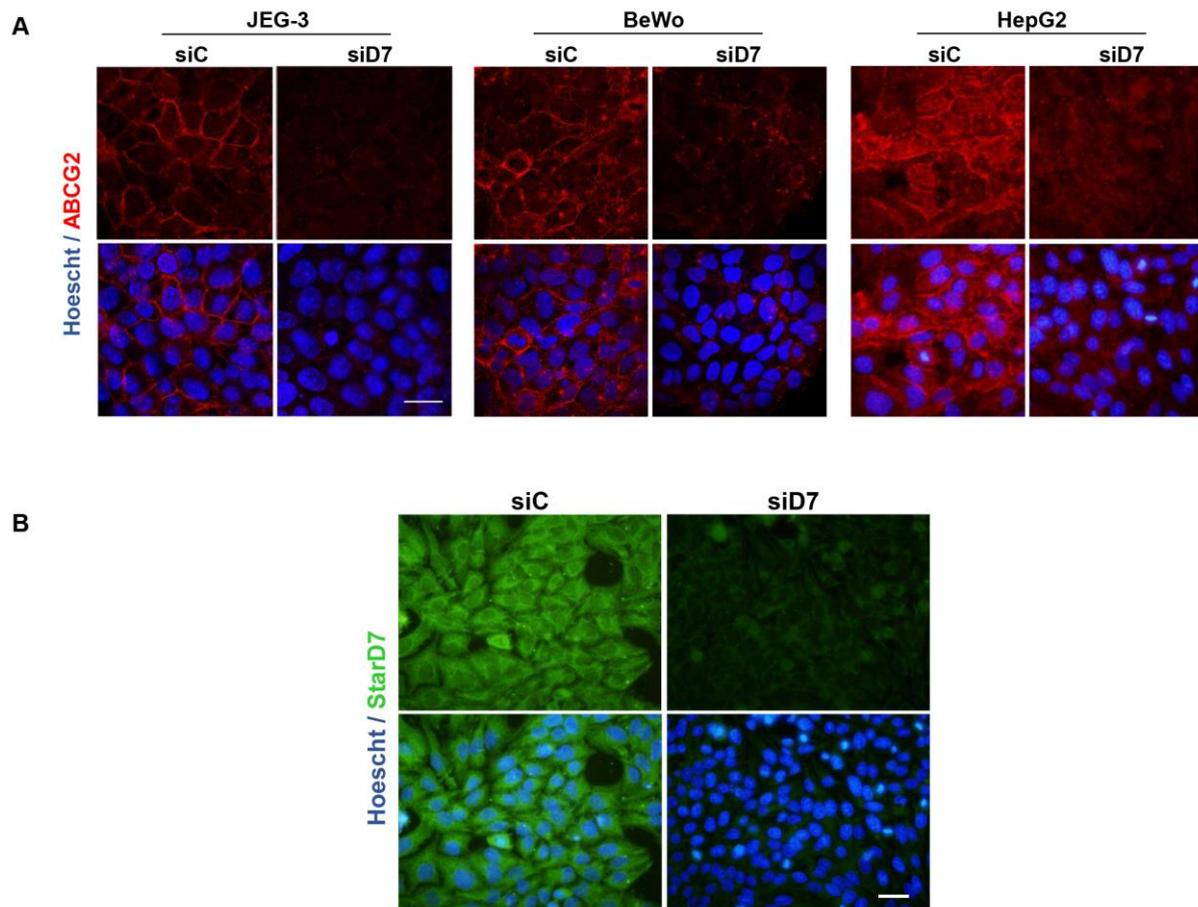


Figura 15. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de ABCG2 en células JEG-3, BeWo y HepG2 silenciadas con siD7 o siC durante 72 h. Se observa en rojo la marcación con el anticuerpo anti-ABCG2 (panel superior), y la superposición con los núcleos teñidos con Hoechst (azul, panel inferior). **B)** Células HepG2 silenciadas durante 72 h con siC o siD7. Se observa la disminución de la fluorescencia verde (anti-StarD7) en las células silenciadas con siD7 (panel superior), y la superposición con los núcleos teñidos con Hoechst (azul, panel inferior). Imágenes obtenidas con microscopio confocal Olympus FLuoview FV300. Barra: 20 μ m (600X).

1.2.2. El silenciamiento de StarD7 altera la funcionalidad de ABCG2

A los fines de evaluar la funcionalidad del transportador de eflujo ABCG2 las células silenciadas con siD7 o siC fueron incubadas con mitoxantrona (MTX), sustrato de ABCG2 (Robey et al., 2001). La MTX es una droga sintética que se intercala en el ADN e inhibe la topoisomerasa II. Se la ha utilizado en la quimioterapia para la leucemia, el linfoma, el cáncer de próstata, de mama y para tratar la esclerosis múltiple (Patel et al., 2013). Considerando que MTX es un sustrato fluorescente que presenta un espectro de emisión-excitación de

635-670 nm, se realizaron ensayos para cuantificar su acumulación intracelular mediante el medición de la fluorescencia.

Células HepG2 y A549 transfectadas con siD7 o siC y cultivadas durante 72 h en placas de 96 pocillos fueron tratadas durante 1 h con 5 ó 20 μM de MTX y posteriormente lavadas durante 3 h. Las lecturas de fluorescencia mostraron una mayor acumulación de MTX en las células silenciadas respecto al control en ambas concentraciones analizadas (Fig. 16 A y B). Simultáneamente, se midió la acumulación de la droga por citometría de flujo observándose, de igual manera, mayor señal de fluorescencia en las células transfectadas con siD7 respecto a siC (Fig. 16 C).

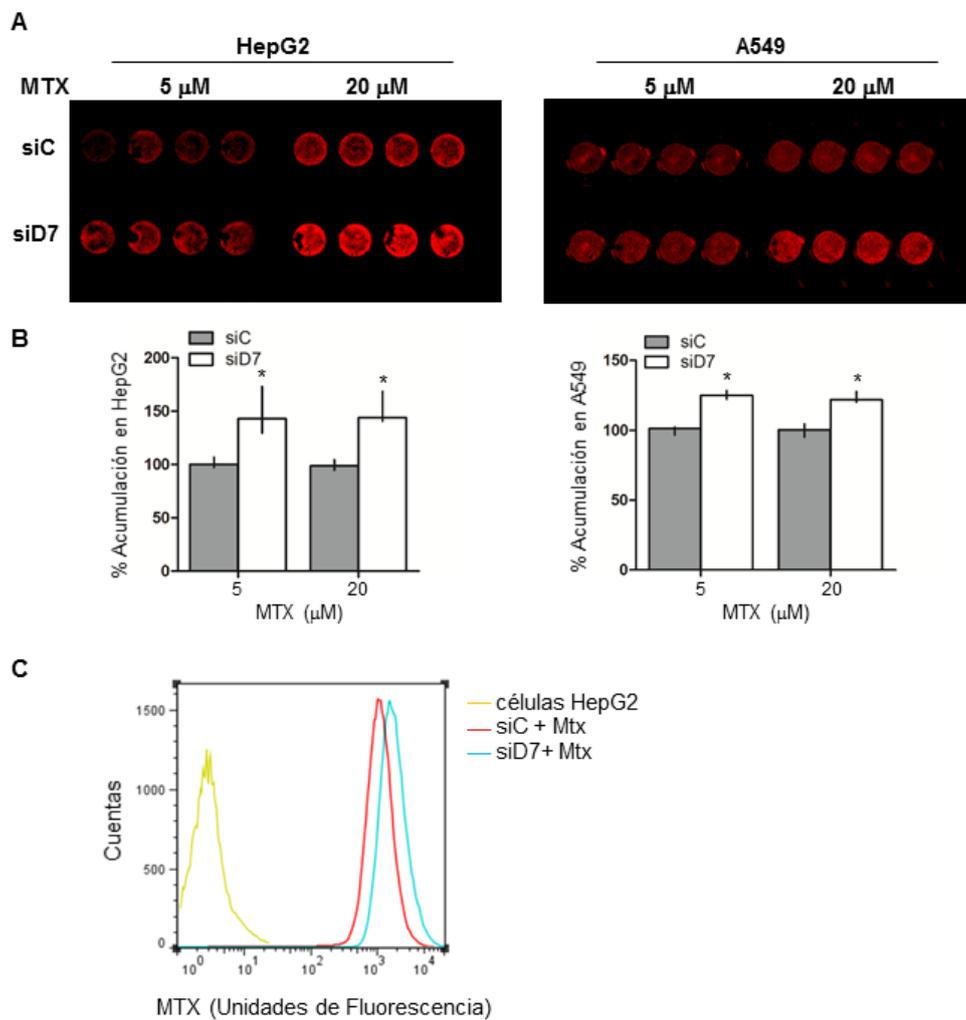


Figura 16. Acumulación intracelular de mitoxantrona en células HepG2 y A549 transfectadas con siD7 o siC y cultivadas durante 48 h. **A)** Se muestra una imagen de fluorescencia representativa de tres ensayos, realizados en placa de 96 pocillos por cuadruplicado, medida en el equipo Odyssey. **B)** Cuantificación del porcentaje de acumulación de mitoxantrona en relación a la intensidad de fluorescencia medida, determinado por el programa *Image Studio*. Se grafica la mediana y el rango

intercuartiles, * $p < 0,01$. **C)** Resultado obtenido por citometría de flujo, el gráfico muestra el desplazamiento del pico de fluorescencia a un valor más alto en las células HepG2 transfectadas con siD7.

Por otro lado, se determinó el eflujo de MTX intracelular. Células previamente silenciadas con siD7 o siC fueron incubadas durante 1 h con 1 ó 5 μM de MTX. Posteriormente, se realizaron mediciones seriadas de fluorescencia a diferentes tiempos de lavado. La Figura 17 muestra que la liberación de la droga es menos eficiente y más lenta en las células silenciadas con siD7 respecto a siC sugiriendo una disminución funcional de ABCG2.

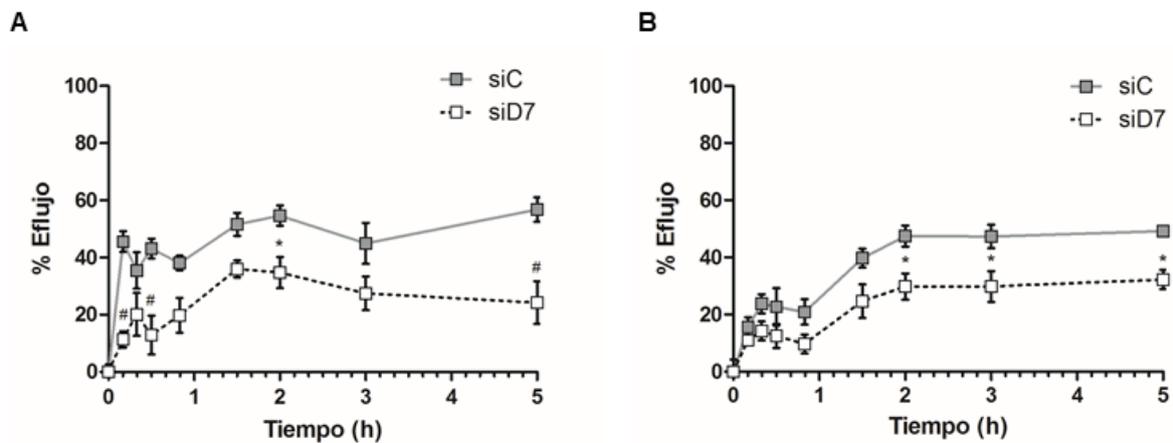


Figura 17. Eflujo de mitoxantrona en células HepG2 silenciadas con siD7 o siC por 72 h. Las células fueron incubadas durante 1 h con 1 μM (A) ó 5 μM (B) de MTX. La fluorescencia se midió a diferentes tiempos de lavado, en el equipo Odyssey y el análisis se realizó con el programa *Image Studio*. Los gráficos representan la media \pm SEM, $n=4$, # $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Se sabe que un déficit en la funcionalidad de ABCG2 expone a las células a una mayor susceptibilidad ante la presencia de drogas quimioterapéuticas, que son específicamente expulsadas del interior celular por el transportador, dejándolas sensibles al tratamiento con estas drogas. En base a esto, se evaluó la citotoxicidad de MTX en células HepG2 tratadas con siD7 y expuestas a la droga durante 24 h. Como se indica en la Figura 18, el silenciamiento de StarD7 aumenta la susceptibilidad de las células expuestas a la droga antineoplásica. Se observó una reducción significativa en la IC50 en las células transfectadas con siD7, desde $1,205 \times 10^{-7}$ M a $1,338 \times 10^{-8}$ M en comparación con el siC.

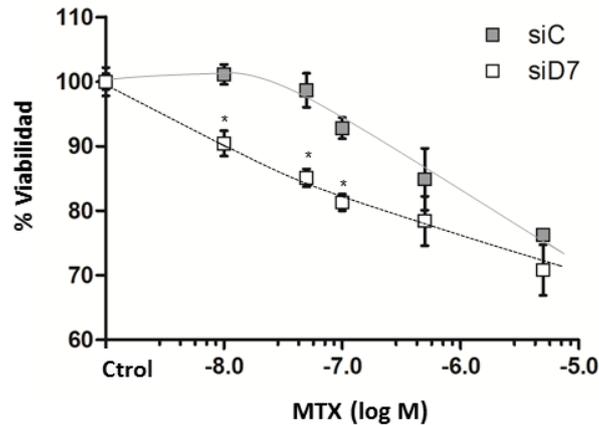


Figura 18. Ensayo de viabilidad, expresado en porcentaje de sobrevivencia en función de concentraciones crecientes de mitoxantrona (MTX): 1×10^{-8} ; 5×10^{-8} ; 1×10^{-7} ; 5×10^{-7} y 5×10^{-6} M. El ensayo se realizó en células HepG2 tratadas con siD7 o siC, durante 48 h e incubadas con la droga durante 24 h o sin la droga (Ctrl). Se grafica la media \pm SEM, n=8. *p < 0,05.

1.2.3. La sobre-expresión de StarD7 incrementa los niveles de ABCG2

En contraposición a los ensayos de silenciamiento de StarD7 se analizó el efecto de la sobre-expresión de la proteína StarD7 sobre los niveles de ABCG2. Para ello, células HepG2 fueron transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas recombinantes: StarD7-c-myc y StarD7-GFP, así como con sus correspondientes vectores vacíos pcDNA/TO/c-myc y pGFP-C1.

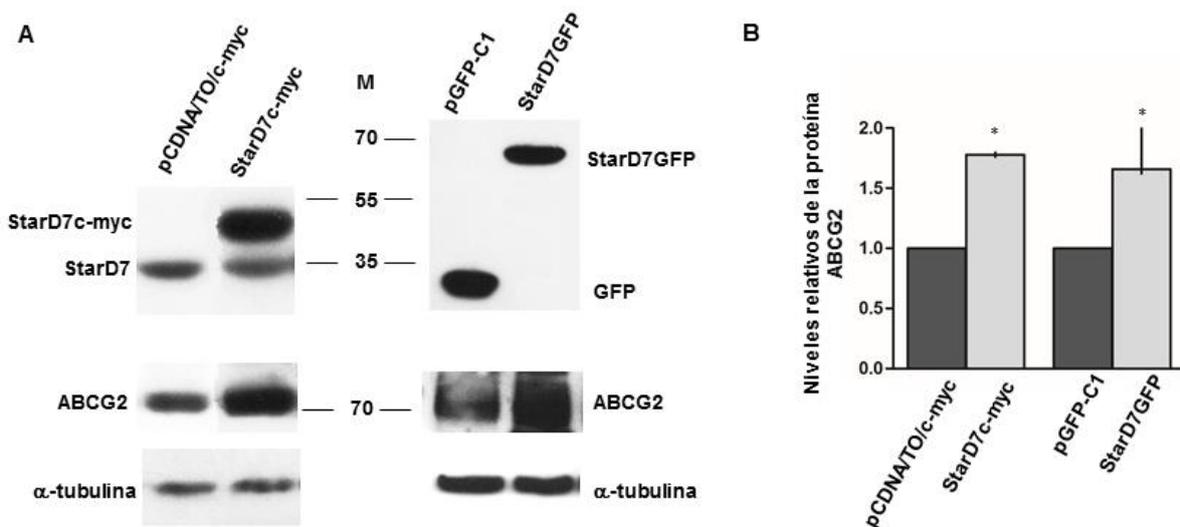


Figura 19. Células HepG2 fueron transfectadas con StarD7-c-myc, StarD7-GFP o sus correspondientes vectores vacíos. **A)** La expresión de ABCG2 endógena (72 kDa) y StarD7 (35 kDa), así como la sobre-expresión de StarD7-c-myc (~ 47 kDa), StarD7-GFP (~ 65 kDa) y GFP (27 kDa) fue analizada por *western blot*. **B)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de la proteína ABCG2 normalizada a tubulina. Los valores representan la mediana y el rango intercuartiles, n = 3, * p < 0,01.

Los resultados indican que la sobre-expresión de StarD7 conduce a un aumento de los niveles de la proteína ABCG2 (Fig. 19). En conjunto estos hallazgos indican que los niveles de expresión de StarD7 y ABCG2 se encuentran correlacionados positivamente.

Como conclusión de esta primera sección, se puede afirmar que:

- ✓ El silenciamiento de StarD7 afectó la expresión global de genes en células JEG-3. Se identificaron y validaron la expresión alterada de los transcritos: ABCG2, Cnx43, TWIST1, MBD2, TGF β RII, THSD7A, SMURF2, KDELC1 y NID1.
- ✓ El silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución en los niveles de expresión de ABCG2/BCRP en diferentes líneas celulares epiteliales (BeWo, HTR8/SVneo, HT-29, A549 y HepG2); mientras que la sobre-expresión de StarD7 produce un aumento en los niveles de ABCG2 indicando que existe una correlación positiva en la expresión de ambas proteínas.
- ✓ La reducción en los niveles de ABCG2/BCRP está asociada a una disminución de su funcionalidad evidenciada por mayor acumulación y menor eflujo de MTX y una incrementada susceptibilidad a la misma.

II. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 EN LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR

2.1. La reducción de StarD7 disminuye la biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos

Como se mencionó, el transporte de lípidos y proteínas entre organelas es un proceso esencial en la organización de los diferentes compartimentos celulares. Este proceso es mediado por el transporte vesicular, mediante la fusión de vesículas a un compartimiento aceptor, o mediante el transporte monomérico entre diferentes organelas (Prinz, 2010). Dado que una de las funciones propuestas para StarD7 es el transporte de PC a la mitocondria (Horibata et al., 2010), se analizó el efecto del silenciamiento de StarD7 en la biosíntesis de fosfolípidos. Para tal fin se realizaron experimentos de marcación metabólica usando $2\text{-}^3\text{H}$ -glicerol. La incorporación de $2\text{-}^3\text{H}$ -glicerol en los fosfolípidos se evaluó tanto en las células JEG-3 transfectadas con siD7 como en cultivos celulares controles (transfectadas con siC). Los resultados muestran una disminución del 40% en la síntesis total de fosfolípidos en células silenciadas con siD7 respecto al control (Fig. 20 A).

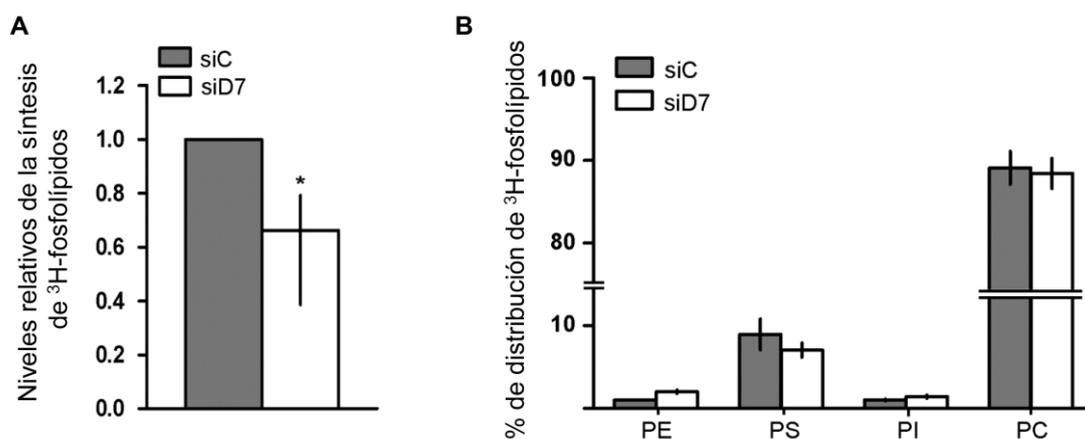


Figura 20 Efecto del silenciamiento de StarD7 en la biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos totales en células JEG-3 tratadas por 48 h con siD7 o siC como control, marcadas con $2\text{-}^3\text{H}$ -glicerol por 3 h. **A)** Síntesis de ^3H -glicerofosfolípidos en células tratadas con siD7 en comparación con el control siC. Los datos representan la mediana y percentilos 25th-75th ($n = 4$, $*p < 0,05$). **B)** Porcentaje de distribución de los principales ^3H -fosfolípidos. Los datos indican la media \pm SEM ($n = 2$).

Además, se determinó el porcentaje de distribución de los principales ^3H -fosfolípidos: PC fue la especie con mayor incorporación del precursor en ambas condiciones analizadas, seguido por PS y después por PI y con un porcentaje menor en PE, sin embargo no hubo diferencias significativas entre las células tratadas con siD7 y siC (Fig. 20 B).

2.2. El silenciamiento de StarD7 genera fragmentación del aparato de Golgi

Con el fin de establecer si existe alguna alteración en las estructuras subcelulares en las células silenciadas con siD7, y teniendo en cuenta que varios reportes indican que la depleción de fosfolípidos, en especial PC, afecta la morfología del complejo de Golgi y RE (van der Sanden et al., 2003; Testerink et al., 2009) se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia la estructura del complejo de Golgi cuando la expresión de StarD7 se encontraba disminuida.

Células HepG2 silenciadas con siD7 o siC fueron cultivadas durante 72 h sobre cubreobjetos, fijadas e incubadas con anticuerpos dirigidos contra proteínas residentes del aparato de Golgi como giantina o GM-130. La Figura 21 muestra las imágenes obtenidas con el anticuerpo anti-giantina, observándose que en las células transfectadas con siC, giantina se localiza en forma condensada en el cis-Golgi con un perfil perinuclear; mientras que en las células transfectadas con siD7 la proteína está presente en forma dispersa a través del citoplasma, indicando una disrupción subcelular en la organización del aparato de Golgi. Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo anti-GM130 y en otras líneas celulares (JEG-3, BeWo y HTR8/Svneo) sugiriendo que StarD7 es importante para el mantenimiento de la estructura del aparato de Golgi y consecuentemente para su función.

Con el fin de estudiar si la función del transporte anterógrado entre RE y el aparato de Golgi es afectada por el silenciamiento de StarD7, se realizaron tratamientos con Brefeldina A (BFA). BFA es utilizada para interferir de forma reversible con el transporte anterógrado (desde RE al Golgi), generando el desensamblado de las proteínas de cubierta COPI y el colapso del aparato de Golgi. Para ello, células HepG2 transfectadas durante 72 h con los siRNAs siD7 o siC, se incubaron 1 h con BFA, con posteriores lavados de 30 min, 1 h 30 min y 2 h 30 min (ya que la droga actúa en forma reversible). Finalizados estos tiempos, el aparato de Golgi se analizó mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-giantina. Los resultados indicaron que el tratamiento con BFA produce el desensamble de las estructuras COPI tanto en las células silenciadas con siC como con siD7. Nótese el aumento en la dispersión de la señal dada por giantina en las células silenciadas con siD7, indicando conservación del transporte retrógrado (Fig. 22).

Se observó que los lavados de 2 h 30 min, posteriores al tratamiento con BFA, permitieron recuperar la organización del aparato de Golgi en las células controles. Por otro

lado, también se logra recobrar la misma estructura fragmentada inicial del aparato de Golgi en las células silenciadas con siD7.

La cuantificación de las células que presentaron el aparato de Golgi fragmentado indicó, en las células HepG2 silenciadas con siD7, un porcentaje del 54% (rango 50-74%) antes del tratamiento con BFA y 71% (rango 58-84%) después de los lavados, ambos valores son significativamente diferente respecto a sus controles ($p < 0,01$) (Fig. 22 B).

Estos hallazgos sugieren que la ausencia de la proteína StarD7 compromete el transporte anterógrado. Estos resultados deben complementarse con ensayos de transporte de cargas, a fin de poder establecer el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno.

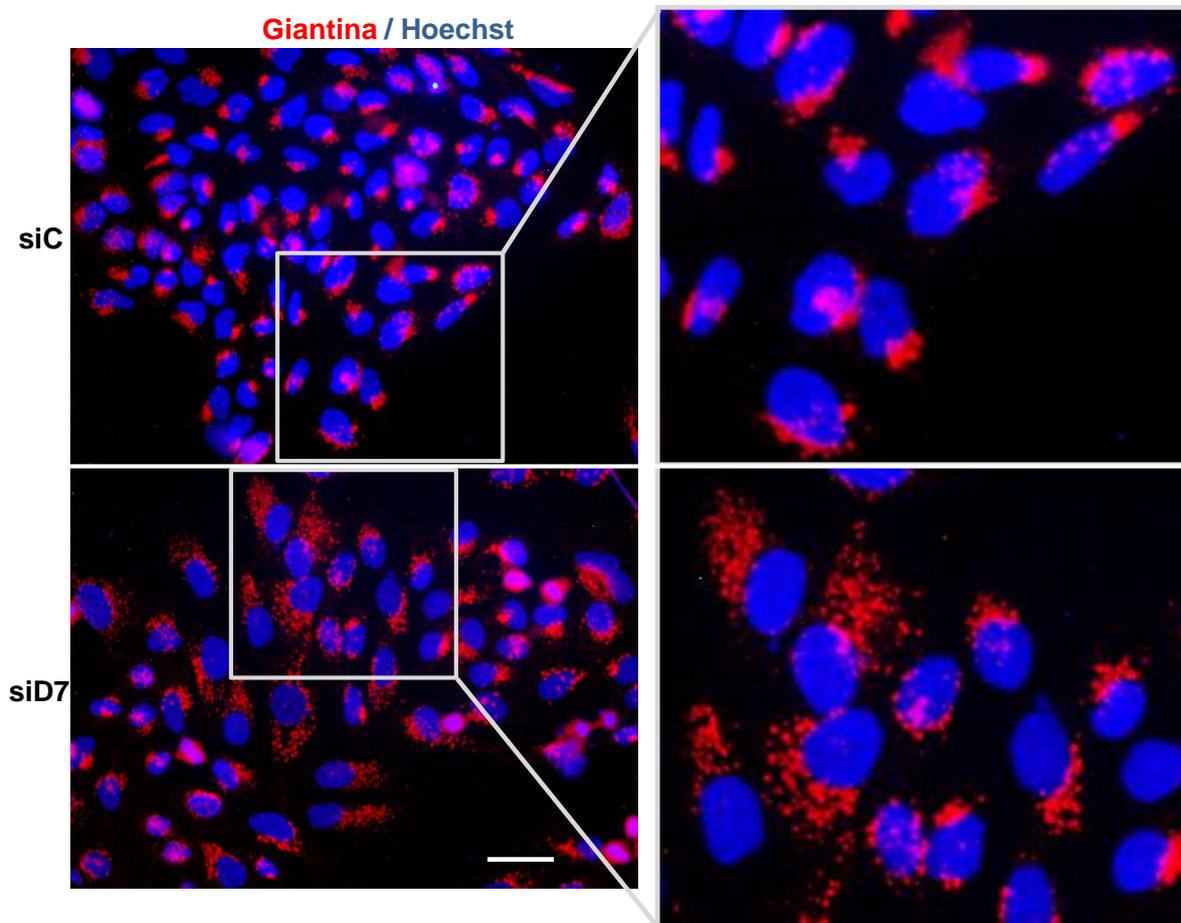


Figura 21. Imágenes representativas de inmunofluorescencias de giantina en células HepG2 silenciadas con siD7 o siC, durante 72 h. En rojo se muestra la marcación con anti-giantina, y los núcleos en azul teñidos con Hoechst. A la izquierda se observa una imagen representativa de cada condición (400X) y a la derecha una zona ampliada, en donde se puede observar claramente la disrupción del complejo de Golgi en las células silenciadas. Barra = 20 μ m.

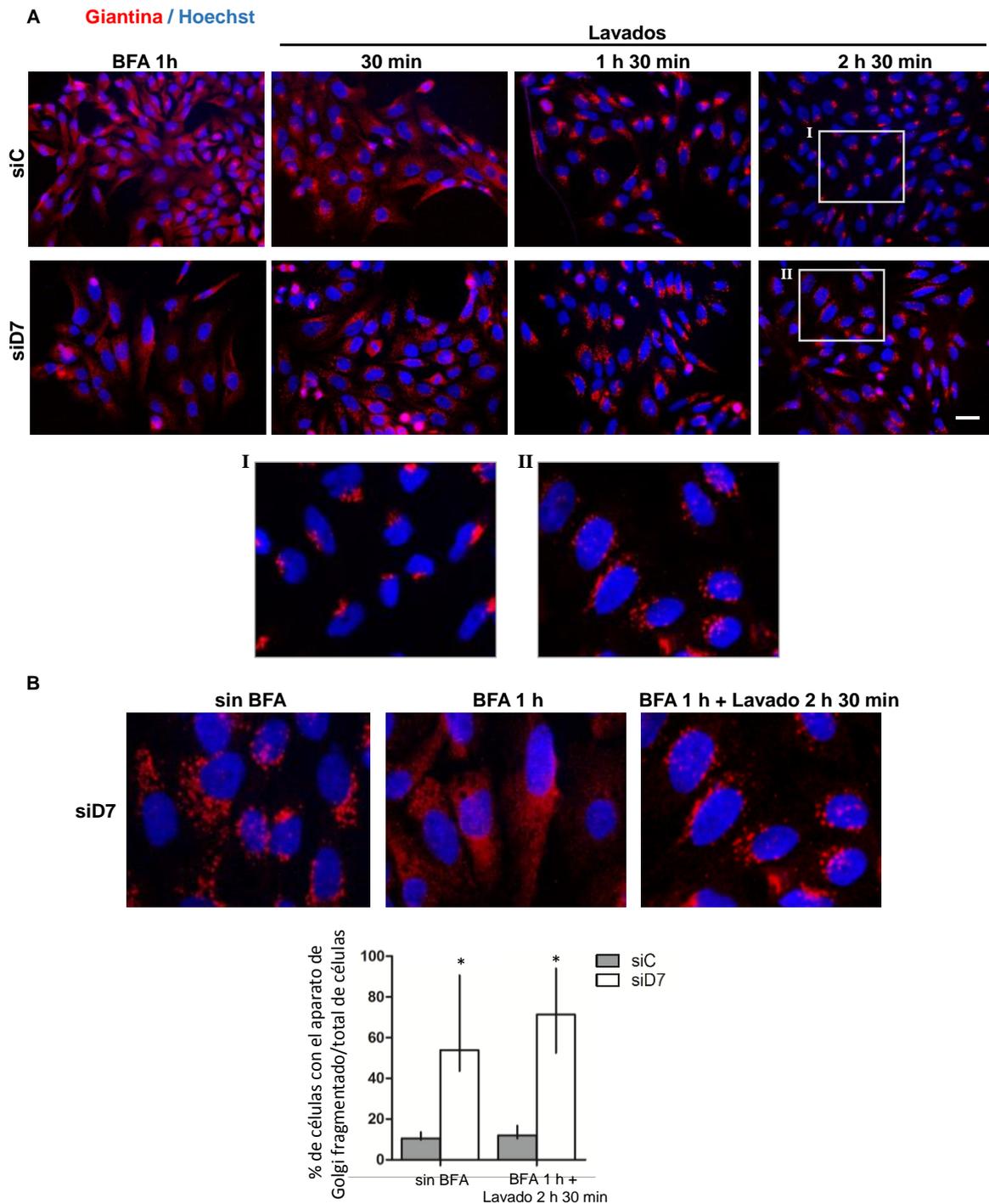


Figura 22. Imágenes representativas de inmunofluorescencias marcadas con anti-giantina en células HepG2 silenciadas durante 72 h y tratadas con Brefeldina (BFA) 5 μ M. **A)** Células HepG2 silenciadas con siD7 o siC, tratadas con Brefeldina (BFA) 5 μ M durante 1 h y posteriores lavados (de 30 min, 1 h 30 min y 2 h 30 min) En el panel inferior se observan imágenes ampliadas después de 2 h 30 min de lavado, obtenidas en siC (I) y en siD7 (II). **B)** En la parte superior, se muestran imágenes ampliadas de células HepG2 transfectadas con siD7, antes y después del tratamiento con BFA y luego de 2 h 30 min de lavado. En rojo se muestra la marcación con anti-giantina y en azul los núcleos teñidos con Hoechst (400X, barra= 20 μ m). Debajo se grafica la cuantificación de células con el aparato de Golgi fragmentado respecto a la cantidad total de células (mediana y rango intercuartiles, *p < 0,01 respecto a siC).

En forma complementaria se analizó la ultraestructura celular mediante microscopía electrónica. Los ensayos fueron realizados en el Centro de Microscopía de la Facultad de Ciencias Médicas, con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906-E.

Las imágenes de microscopía electrónica obtenidas en las células silenciadas con siD7 mostraron desorden en el sistema de endomembranas, presentando RE dilatado, con numerosas mitocondrias perinucleares (muchas de las cuales exhibieron una morfología anormal) (Fig. 23 y 24). Además, se observó acumulación intracelular de lípidos y glucógeno sugiriendo que el impacto del silenciamiento de StarD7 genera en el sistema de endomembranas alteraciones en el metabolismo y/o transporte de lípidos.

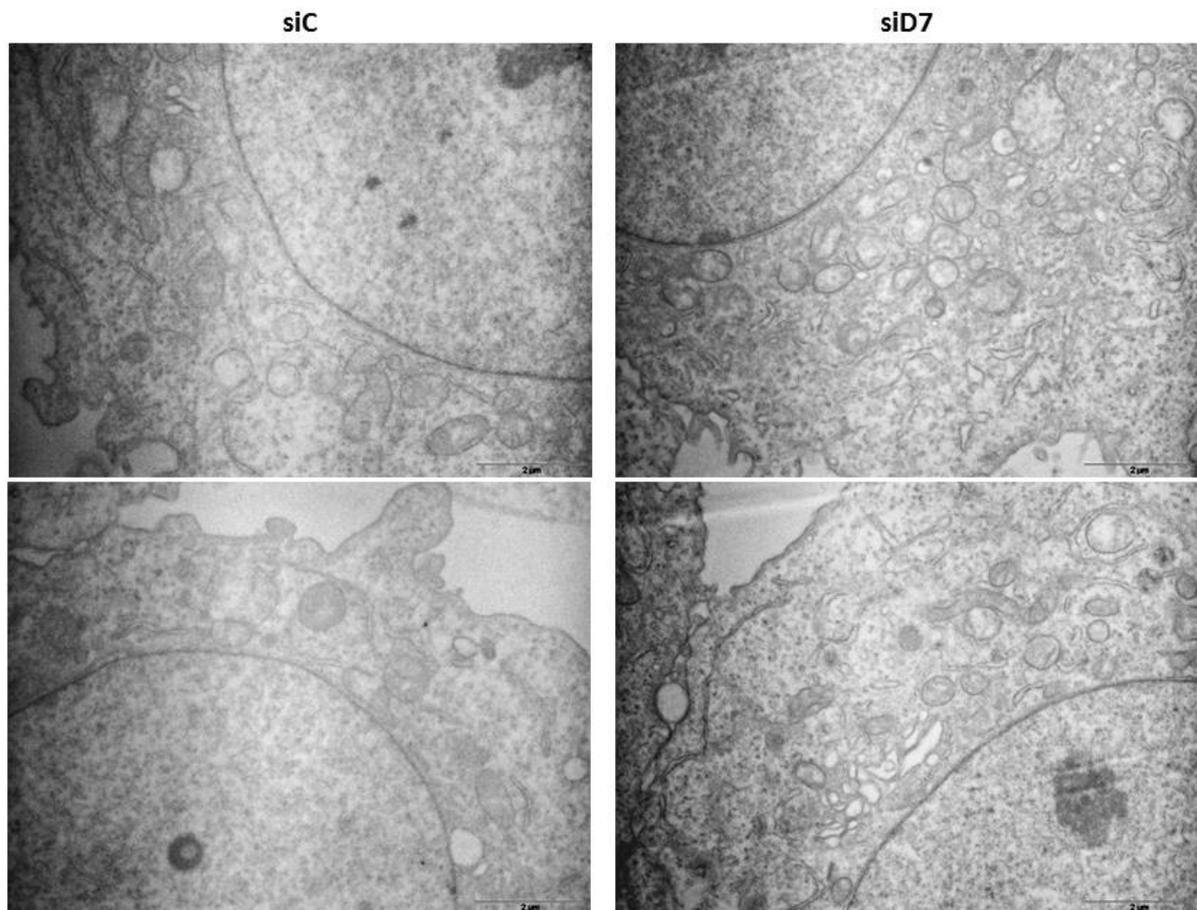


Figura 23. Microscopía electrónica de células HepG2 transfectadas con siD7 o siC como control. Se muestra dos imágenes representativas de cada situación (magnificación: 10.000X).

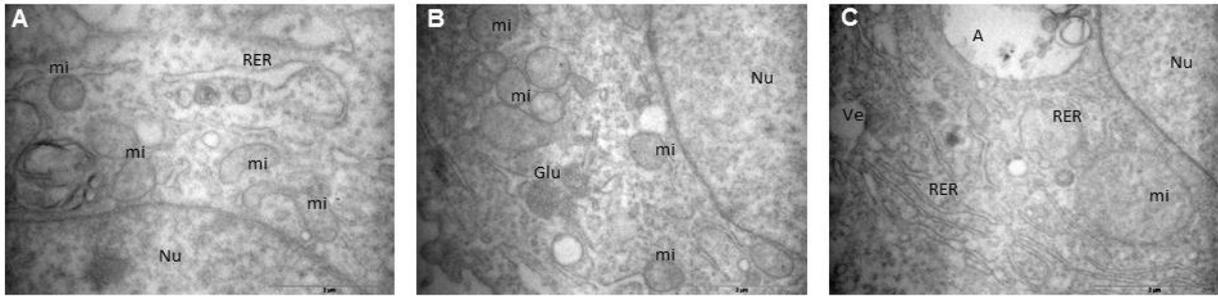


Figura 24. Microscopía electrónica de células HepG2 silenciadas de StarD7. Se observa un buen desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (RER) con cisternas dilatadas y vesículas (ve), presencia de numerosas mitocondrias (mi) de gran tamaño perinucleares y núcleo (Nu) activo con predominio de eucromatina. En la figura B se observa acumulación de glucógeno (Glu) y en la figura C un autofagosoma (A), producto de digestión intracelular (quizás de mitocondrias). Fotos tomadas a 16.700X.

2.3. La disminución de la proteína StarD7 produce estrés del retículo endoplásmico

Como se mencionó el RE es el principal sitio de síntesis de proteínas y lípidos, biogénesis de membranas, metabolismo de xenobióticos y almacenamiento de calcio celular. En el RE rugoso (RER), las proteínas (incluyendo hormonas, factores de crecimiento, receptores, entre otras) que están siendo sintetizadas en los ribosomas, se pliegan y sufren modificaciones post-traduccionales. Además el RE presenta un entorno oxidativo, crítico para la formación de uniones disulfuros, entre otras modificaciones (Mandl et al., 2013).

Varios reportes demuestran que la alteración en el transporte entre el RE y Golgi, produce acumulación de proteínas en el RE ocasionando estrés de retículo. Esto mismo se produce frente al tratamiento con BFA (Moon et al., 2012), observándose un perfil similar cuando StarD7 es silenciada.

Como se mencionó, la inducción de estrés de RE origina una respuesta a proteínas mal plegadas (UPR: *Unfolded Protein Response*), la cual es sensada a través de tres vías de señalización que involucran la participación de las proteínas PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 (*inositol-requiring 1*) y ATF6 (*activating transcription factor 6*) (Fu et al., 2011). Una actividad sostenida de UPR, indica que el estrés del RE no puede ser suprimido y no se puede re-establecer la homeostasis desencadenando vías de apoptosis que llevan a la célula a la muerte.

La UPR conduce a una disminución de la traducción de proteínas, degradación de proteínas mal plegadas e inducción de chaperonas moleculares como calreticulina, GRP78/BiP (*Glucose-regulated protein*) y CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Das et al., 2008; Haefliger et al., 2011) (Fig. 10). GRP78 es una chaperona, miembro de la familia de HSP70, que facilita el plegado de proteínas dentro del lumen del RER (Burton et al., 2011).

Para evaluar si el silenciamiento de StarD7 conduce a una respuesta celular “tipo UPR”, se determinó la expresión de las principales proteínas involucradas en este proceso, mediante ensayos de *western blot*. Las células HepG2 fueron transfectadas con siC o siD7 y se obtuvieron extractos proteicos a las 6, 12, 24, 48 y 72 h post-silenciamiento. La Figura 25 muestra los cambios en los niveles de expresión de las proteínas: IRE1 α , calnexina, PDI (*protein disulfide isomerase*), BiP y PERK en función del tiempo de silenciamiento normalizadas con actina. Se observó un aumento temprano de las chaperonas calnexina y BiP (6 h) en las células silenciadas con siD7 para retornar a valores cercanos al control a las 48 h de silenciamiento. La quinasa PERK presentó bajos niveles a las 6 h post-silenciamiento con siD7 con un valor máximo a las 12 h de transfección con siD7.

En relación a la proteína sensora de estrés de RE IRE1 α , su expresión comenzó a incrementar a las 24 h de silenciamiento con siD7 permaneciendo elevada, incluso a las 72h post-silenciamiento, mientras que los niveles de PDI no mostraron cambios importantes. Se observó que a las 72 h de silenciamiento, los niveles de BiP, calnexina y PERK disminuyen en relación al control.

En conjunto estos resultados sugieren que el silenciamiento de StarD7 genera una respuesta temprana de las proteínas involucradas en mantener la homeostasis del RE.

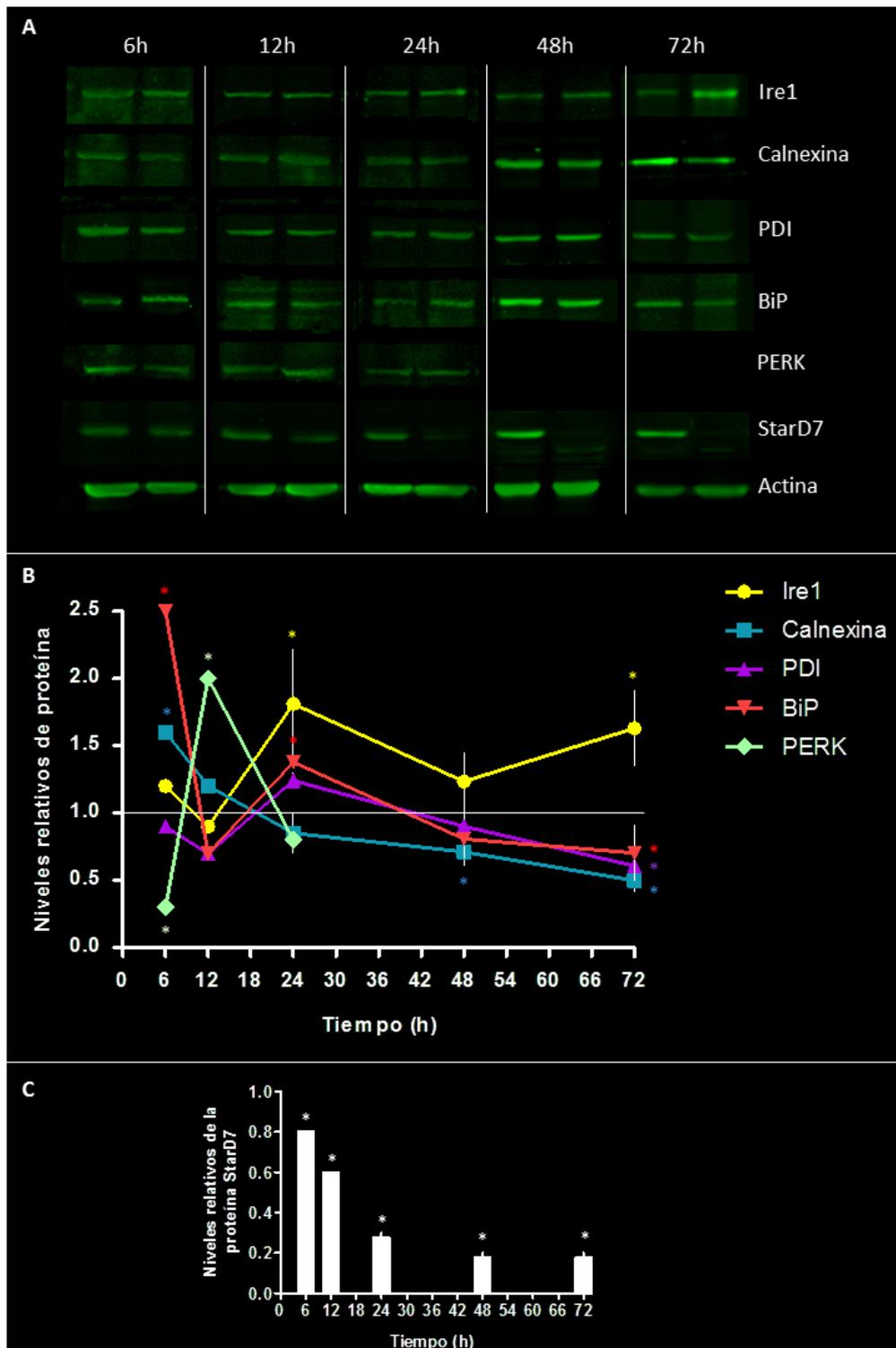


Figura 25. Respuesta de estrés de retículo endoplásmico. **A)** Ensayos de *western blot* realizados con extractos proteicos de células HepG2 silenciadas durante 6, 12, 24, 48 y 72 h con siD7 o siC. Se muestran imágenes representativas reveladas en el lector Odyssey. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las bandas normalizadas con actina en función del tiempo de silenciamiento de StarD7, realizado con el programa *Image Studio*; siendo 1.0 el valor designado para el control (células transfectadas con siC). **C)** Niveles relativos de la proteína StarD7 a lo largo de las horas de silenciamiento. Los datos representan la mediana y el rango intercuartiles (* $p < 0,01$).

Como se mostró en la Figura 13, uno de los transcritos que presentaron un aumento significativo en las células JEG-3 silenciadas con siD7, fue KDELC1 (ver resultados del *Microarray*). Entre las proteínas residentes del RE que contienen este tetrapéptido conservado (KDEL) en la región C-terminal se encuentran entre otras las chaperonas BiP y PDI. El aumento del transcritpo KDELC1 observado inicialmente en las células JEG-3 silenciadas fue confirmado en las líneas celulares HTR8/SVneo y HepG2 silenciadas con siD7 respecto al control (Fig. 26).

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que StarD7 es requerida para mantener la homeostasis intracelular evitando el estrés de RE.

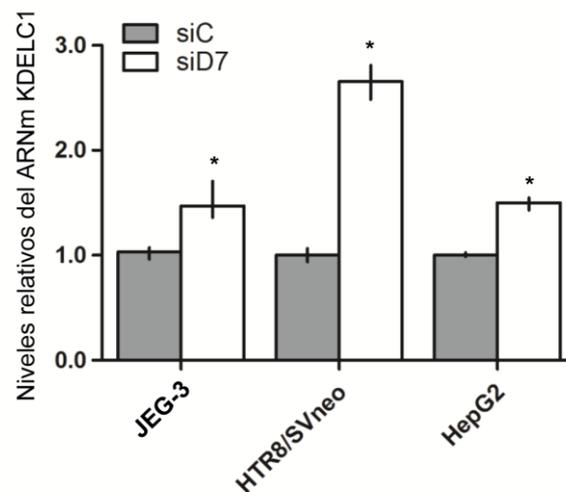


Figura 26. Efecto del silenciamiento de StarD7 en la expresión del transcritpo KDELC1 en células JEG-3, HTR8/SVneo y HepG2 transfectedas con siD7 o siC. Se analizó mediante RT-PCR en tiempo real, la expresión de KDELC1. Los gráficos representan los niveles relativos del transcritpo respecto al control (normalizados con ciclofilina A). Los resultados se expresan como la mediana y el rango intercuartiles, * $p < 0,01$, $n=3$.

2.4. StarD7 protege a las células del estrés oxidativo

Dado que varios estudios señalan un “*crosstalk*” entre la respuesta a estrés de RE y el estrés oxidativo (Bhandary et al., 2012) se analizaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células silenciadas con siD7. Para tal fin, células HepG2 previamente silenciadas con siD7 o siC se incubaron con o sin diferentes concentraciones de H_2O_2 evaluando la generación de ROS. Se utilizó el colorante H2DCFDA (2’ 7’-dichlorodihydrofluorescein diacetate) el cual es permeable a la membrana celular, es

escindido por las esterasas intracelulares, y se combina con ROS produciendo fluorescencia. Los resultados mostraron una mayor intensidad de fluorescencia en células silenciadas en condiciones normales (sin H_2O_2) respecto al control y un aumento significativo en la generación de ROS cuando las células silenciadas con siD7 fueron incubadas con $200 \mu M$ de H_2O_2 , durante 24 h, en comparación con las células control (Fig. 27 A).

Adicionalmente, ensayos de viabilidad celular demostraron que las células HepG2 depletadas de StarD7 fueron más sensibles al tratamiento con H_2O_2 (Fig. 27 B), concordando con los resultados anteriores donde la ausencia de StarD7 predispone a una mayor producción de ROS y aumento de estrés celular.

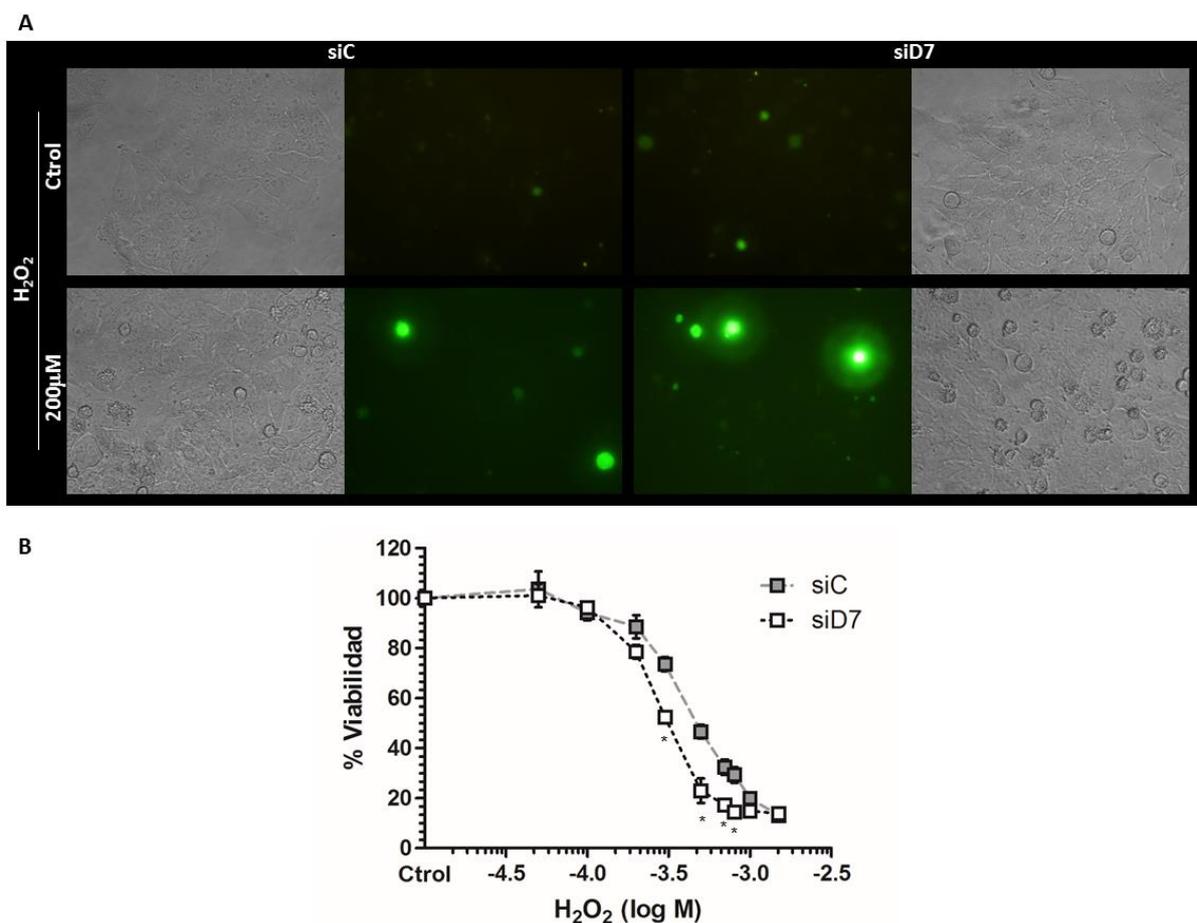


Figura 27. Células HepG2 fueron silenciadas con siD7 o siC durante 48 h, y posteriormente tratadas con H_2O_2 , o sin H_2O_2 (Ctrl) durante 24 horas. **A)** La imagen muestra células incubadas en condiciones normales (sin H_2O_2) y marcadas con H2DCFDA (verde) (panel superior). La exposición de las células transfectadas con siD7 a $200 \mu M$ de H_2O_2 durante 24 h genera un aumento de las ROS en comparación con las células control (panel inferior). Imágenes a 400X. **B)** El porcentaje de viabilidad se determinó por el ensayo MTT. Se observó una reducción de IC₅₀ en las células HepG2 transfectadas con siD7 y expuestas a H_2O_2 respecto al control ($4,29 \times 10^{-4} M$ vs $8,89 \times 10^{-4} M$). Las concentraciones de H_2O_2 utilizadas fueron: 50, 100, 200, 300, 500, 700, 800, 1000 y $1500 \mu M$. Se grafica media \pm SEM, n = 8, * p < 0,01.

A los fines de establecer si el aumento en la generación de ROS inducido por el silenciamiento de StarD7 conduce a una modificación del “status” de la reserva antioxidante celular se analizó la expresión de la enzima antioxidante hemo-oxigenasa 1 inducible (HO-1) en las células JEG-3, BeWo y HTR8/SVneo silenciadas con siD7 (Fig. 28). Los resultados indican que el ARNm y los niveles de la proteína HO-1 aumentaron significativamente en las células trofoblásticas silenciadas de StarD7 en comparación con el control ($p < 0,01$).

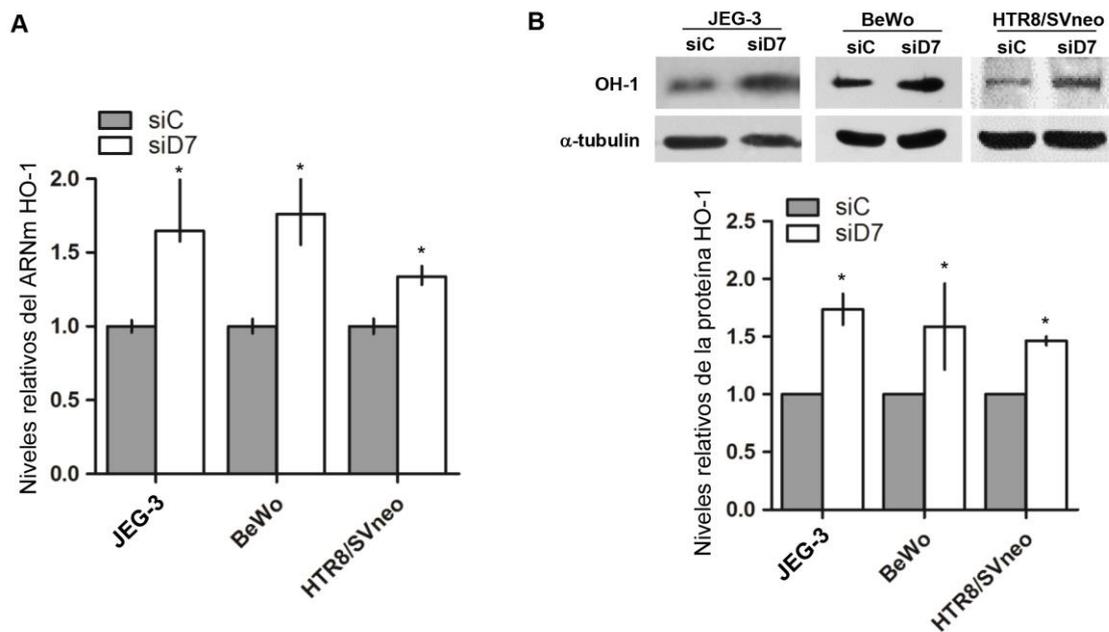


Figura 28. Expresión de hemo-oxigenasa-1 (HO-1) en células JEG-3, BeWo y HTR8/SVneo transfectadas durante 72 h con siD7 o siC. **A)** Se analizó mediante PCR en tiempo real, la expresión del transcrito de HO-1, el gráfico representa los niveles relativos del transcrito respecto al control (normalizados con ciclofilina A). **B)** Los niveles de la proteína se midieron por ensayos de *western blot*. Arriba se muestran ensayos representativos para cada línea celular y abajo, la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de la proteína HO-1 respecto al control, normalizados con tubulina. (Mediana y el rango intercuartiles de tres experimentos independientes * $p < 0,01$, $n=3$).

Para concluir esta sección, se puede afirmar que el silenciamiento de StarD7:

- ✓ Disminuye la biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos totales.
- ✓ Altera la estructura del Golgi, posiblemente interfiriendo con el transporte anterógrado.

- ✓ Produce desorden del sistema de endomembranas, con numerosas mitocondrias con morfología anormal.

- ✓ Origina cambios en la expresión de proteínas y genes que responden a la respuesta de tipo UPR frente al estrés de RE.

- ✓ Aumenta la sensibilidad de las células frente a una injuria celular debido a una mayor cantidad de ROS.

- ✓ Incrementa los niveles de la enzima hemo oxigenasa-1.

III. ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO DE StarD7 EN DIFERENTES PROCESOS CELULARES

3.1. El silenciamiento de StarD7 disminuye la proliferación celular

Con el propósito de analizar el impacto del silenciamiento de StarD7 en el proceso de proliferación celular, se evaluó la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) al ADN de células que se encuentran en replicación (en fase S).

La cantidad de BrdU incorporada se midió por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-bromodeoxiuridina (Fig. 29). Se observó un menor número de núcleos en proliferación (rojo, BrdU-positivos) respecto al total de núcleos teñidos con Hoechst (azul) en células tratadas con siD7 respecto al control. La cuantificación del ensayo de proliferación expresada como porcentaje mostró una disminución del 41% en JEG-3, 26% en BeWo y del 37% en HTR8/SVneo silenciadas con siD7 respecto al control, $p < 0,01$.

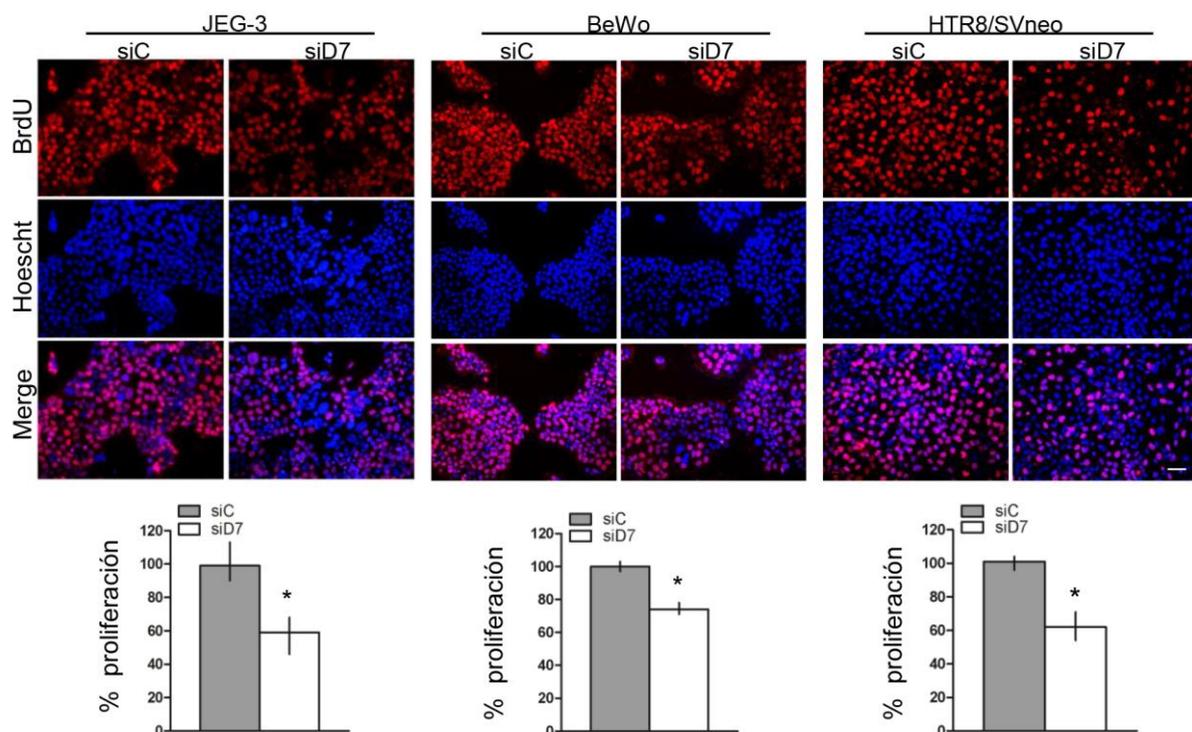


Figura 29. La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de BrdU (rojo) en células JEG-3, BeWo y HTR8/SVneo tratadas con siD7 o siC. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y se muestran las imágenes superpuestas (Merge). Las imágenes son representativas de tres experimentos con resultados consistentes (200X, barra= 20 μ m). En el panel inferior se grafica el porcentaje de proliferación obtenido en cada línea celular. Las barras indican la mediana y el rango intercuartiles, $*p < 0,01$.

A los fines de confirmar que el silenciamiento de StarD7 produce una disminución en la proliferación se determinó la incorporación de [5'-³H]-timidina (20 μCi/ml, actividad específica: 20 Ci/mmol). Los resultados mostraron una disminución del 28% ± 6% (media ± SEM, p< 0,05) en la incorporación de timidina en células JEG-3 silenciadas respecto al control.

3.2. El silenciamiento de StarD7 disminuye la migración celular

Se analizó el efecto de la reducción de StarD7 sobre la migración celular mediante el ensayo de reparación de la herida en monocapas de células JEG-3, HepG2 y HTR8/SVneo. Heridas de tamaño similar se introdujeron en las células que habían sido tratadas 72 h con siD7 o siC. Como se muestra en la Figura 30, las células control migraron más rápido cubriendo gradualmente el espacio de la herida. Se observa que 8 horas (en la línea HTR8/SVneo) ó 24 horas (en las líneas JEG-3 y HepG2) después de realizada la herida, la misma se encontró casi totalmente cerrada en las células transfectadas con siC (control).

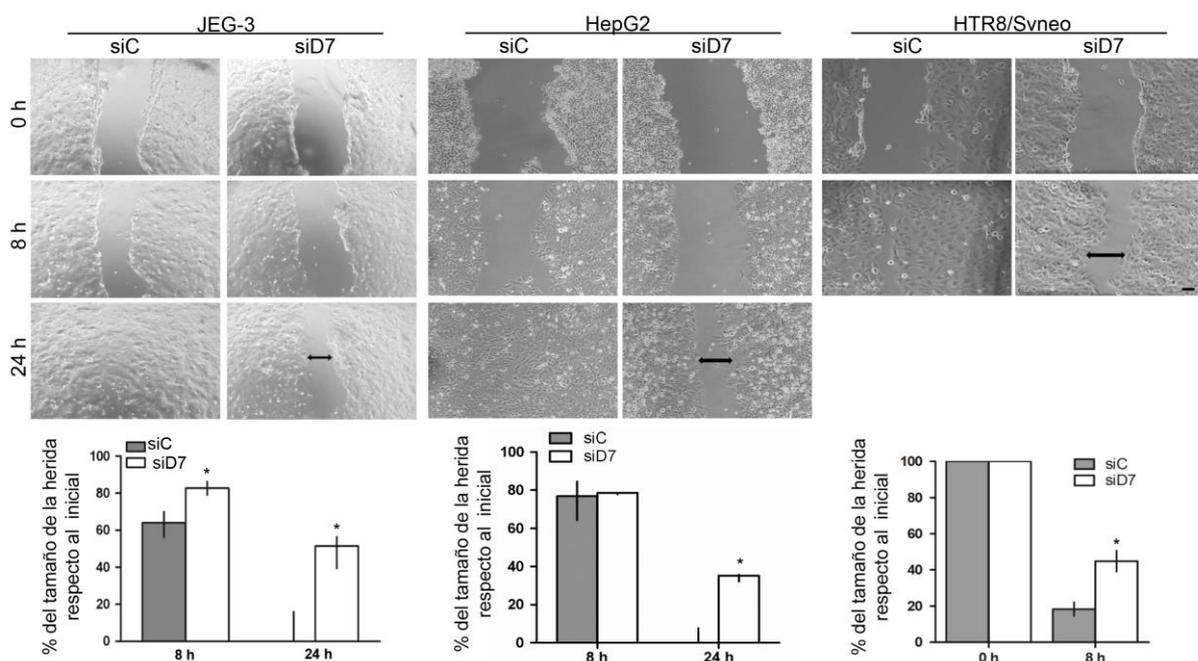


Figura 30. Ensayo de la herida en células JEG-3, HepG2 y HTR8/SVneo tratadas 72 h con siD7 o siC. La herida se generó mediante un tip fino de pipeta en una monocapa de células confluentes. Se muestran las fotos representativas de tres experimentos independientes, obtenidas por microscopía de contraste de fase a las 0, 8 y 24 h (100X, barra= 20μm). Se presentan gráficamente el porcentaje del tamaño de la herida respecto a la distancia inicial (0 h), *p<0,01 en comparación con las células transfectadas con siC. Las barras indican la mediana y el rango intercuartilos de tres experimentos independientes.

Por el contrario, las células transfectadas con siD7 mostraron disminución en la migración celular, con una velocidad de cierre de la herida menor, permaneciendo abierta después de 24 h de cultivo en las células JEG-3 y HepG2 y después de 8 h en las monocapas de células HTR8/SVneo.

Adicionalmente, se realizaron ensayos en el sistema bicameral de *Transwell* (Cole Parmer), utilizando células JEG-3, HTR8/SVneo y HepG2 transfectadas durante 72 h con siD7 o siC. Se utilizaron filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μm , que permite el paso de las células que son colocadas en la parte superior del mismo, como se detalla en Materiales y Métodos. Células transfectadas con siC o siD7, se incubaron durante 48 h dentro del *Transwell* permitiendo que atraviesen el filtro hacia la parte inferior. La Figura 31 muestra los resultados de los experimentos con una disminución en la migración del 40% en JEG-3, 33% en HTR8/SVneo y 50% en células HepG2 silenciadas respecto a células tratadas con siC.

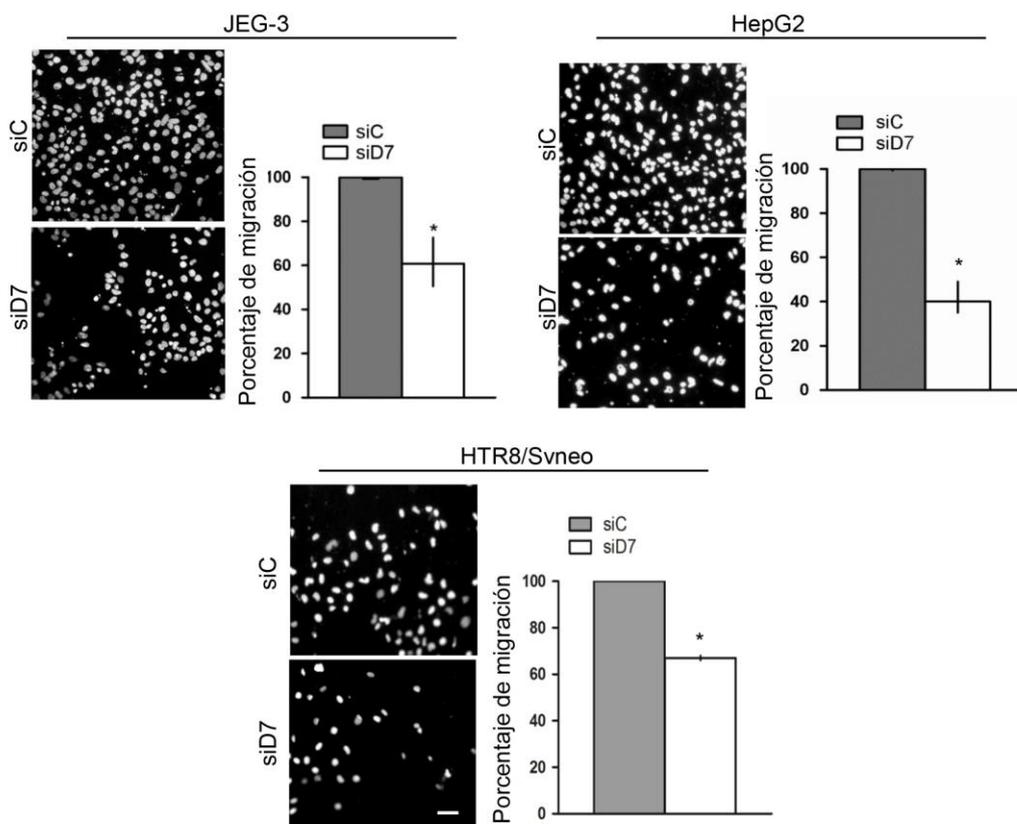


Figura 31. Ensayo de migración de células JEG-3, HTR8/SVneo y HepG2 silenciadas con siD7 analizadas en el sistema de *Transwell*. En el panel izquierdo se muestran imágenes representativas de los núcleos teñidos con Hoechst de las células silenciadas que migraron durante 48 h hacia el compartimiento inferior del *Transwell* (200X, barra= 20 μm). El gráfico de barras representa el porcentaje de migración; el resultado se expresa como la mediana y el rango intercuartiles de tres experimentos independientes, *p < 0,01.

3.3. Las células tratadas con siRNA contra StarD7 presentan mayor adhesión celular

A continuación, se investigó si el silenciamiento de StarD7 modifica la adhesión celular. El ensayo se realizó en células HTR8/SVneo, derivada de CTBs extravellosos invasivos, como modelo de estudio. La Figura 32 muestra claramente que las células tratadas con siD7 permanecieron más adheridas a la superficie de vidrios recubiertos con laminina-1 que las células tratadas con el siC.

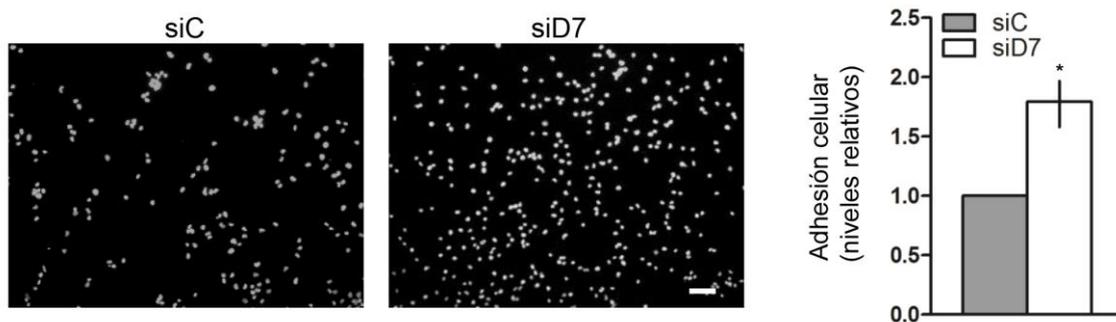


Figura 32. Ensayo de adhesión de células HTR8/SVneo silenciadas con siD7 o siC. En el panel izquierdo se muestran los núcleos teñidos con Hoechst de las células adheridas al vidrio recubierto con laminina. Las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia son representativas de tres experimentos independientes realizados por duplicado (100X, barra= 50 μ m). El gráfico de barras representa la cuantificación de las células silenciadas con siD7 adheridas respecto al control. Se expresa la mediana y el rango intercuartiles, * $p < 0,01$.

3.4. StarD7 regula la diferenciación de las células trofoblásticas

Trabajos previos del laboratorio sugieren que StarD7 participa en el proceso de diferenciación y fusión de CTBs (Angeletti et al., 2008; Angeletti et al., 2011). El proceso de sincialización se acompaña de aumento en marcadores bioquímicos de diferenciación como β hCG (hormona Gonadotrofina Coriónica-subunidad β) y sincitina-1, y por cambios morfológicos, evidenciados por la formación de células gigantes multinucleadas (Huppertz et al., 2006). A los fines de establecer la participación de StarD7 en ambos procesos se realizaron los ensayos en las líneas celulares fusogénicas JEG-3 y BeWo derivadas de coriocarcinoma.

Se midieron los niveles de los transcritos de β hCG y sincitina-1, en JEG-3 y BeWo transfectadas con siD7 y siC (Fig. 33) a las 48 y 72 h de cultivo. Los resultados muestran un evidente aumento de estos marcadores cuando StarD7 fue silenciada. El incremento del

ARNm de β hCG fue mayor en células BeWo que en JEG-3 tratadas con siD7, respecto al control, incrementando a las 72 h de cultivo 11 veces en BeWo y 2 veces en JEG-3 ($p < 0,01$).

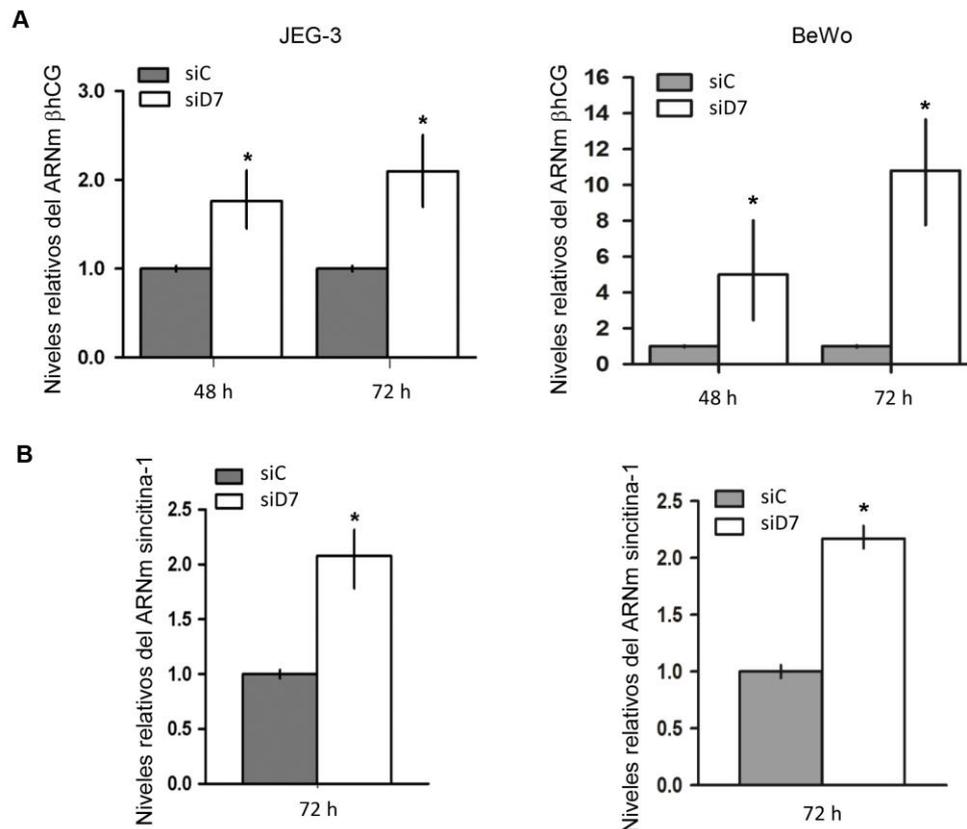


Figura 33. Expresión de marcadores de diferenciación bioquímica en células JEG-3 (izquierda) y BeWo (derecha) transfectadas con siD7 o siC. Los transcritos de β hCG (**A**) y sincitina-1 (**B**) se cuantificaron mediante RT-PCR en tiempo real. Se grafican los niveles relativos respecto al siC normalizado con ciclofilina A. Las barras indican la mediana y el rango intercuartiles, * $p < 0,01$. (n=5).

Paralelamente se analizó si el aumento del ARNm de β hCG también se acompañó con un aumento en los niveles de la proteína. Efectivamente, se observó un incremento significativo en la síntesis de la proteína β hCG en células silenciadas con siD7 (Fig. 34). Al igual que los niveles de transcritos, el aumento de la proteína β hCG fue mayor en células BeWo que en JEG-3, con incrementos de 13 y 2 veces, respectivamente, a las 72 h de cultivo ($p < 0,01$). Adicionalmente, se observó un aumento en la secreción de β hCG en células JEG-3 transfectadas con siD7 en comparación con las células tratadas con el siC (Fig. 34 E).

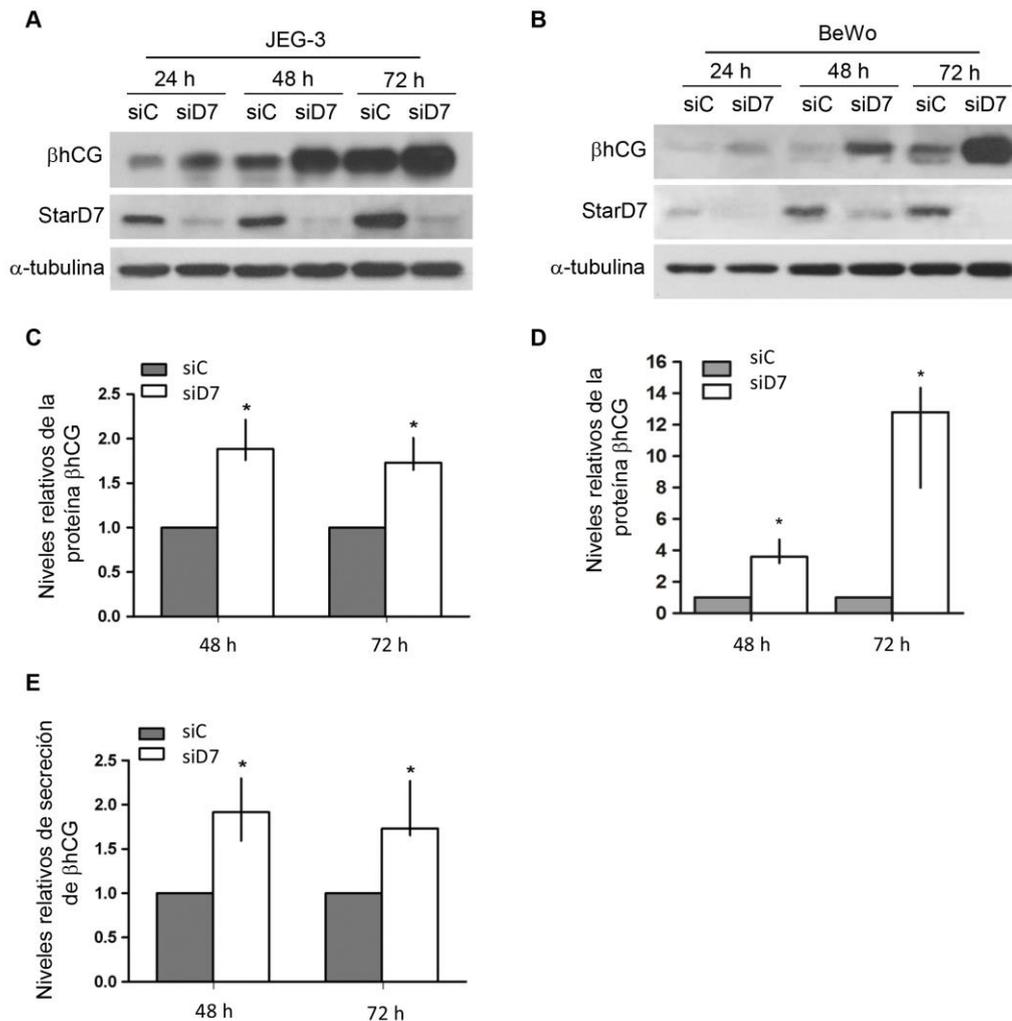


Figura 34. Expresión de marcadores de diferenciación bioquímica en células JEG-3 (A, C, E) y BeWo (B y D) transfectadas con siD7 o siC. **(A y B)** Imagen representativa de los niveles proteicos de βhCG y StarD7 determinados mediante ensayos de *western blot*. **(C y D)** Cuantificación densitométrica de βhCG relativa al valor del siC normalizado con tubulina de cinco experimentos independientes. **(E)** βhCG secretada al medio de cultivo en células JEG-3 cuantificada por ELISA (Siemens Immulite 2000). Las barras indican la mediana y el rango intercuartiles, * $p < 0,01$. (n=5).

Se sabe que cultivos primarios de CTBs diferencian espontáneamente *in vitro* formando estructuras tipo sinciciales (Loregger et al., 2003). Considerando que JEG-3 y BeWo son líneas celulares indiferenciadas, se analizó si el incremento en los marcadores bioquímicos de diferenciación se acompañó con la formación de estructuras tipo sinciciales en las células tratadas con siRNA contra StarD7. Para tal fin, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína desmoplaquina, la cual marca la unión desmosomal. Los resultados muestran un aumento en el número de células gigantes multinucleadas en células silenciadas con el siRNA contra StarD7, respecto al control ($p < 0,01$) (Fig. 35).

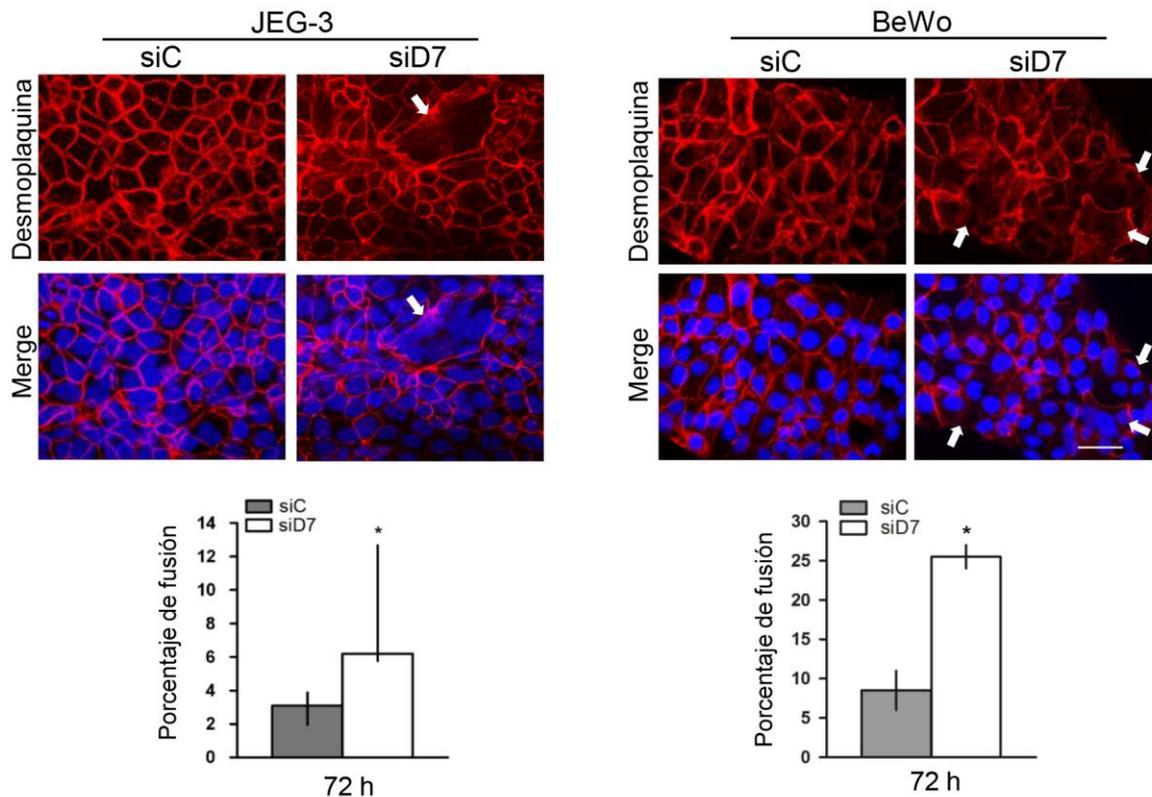


Figura 35. Detección por inmunofluorescencia de desmoplaquina (rojo) y la superposición con núcleos teñidos con Hoechst (azul) en células JEG-3 tratadas con siD7 o siC. Se muestran imágenes representativas de la formación de estructuras tipo sinciciales (flechas) en células JEG-3 (izquierda) y BeWo (derecha) tratadas con siD7 (400X, barra= 20 μ m). Debajo se grafica el porcentaje de fusión correspondiente (número de núcleos en sincicios respecto al total) (n=3). Las barras indican la mediana y el rango intercuartiles, *p < 0,01.

En resumen en esta parte del trabajo se concluye que el silenciamiento de StarD7:

- ✓ Disminuye la proliferación celular.
- ✓ Retarda la reparación de la injuria de la monocapa celular (ensayo de *wound healing*) y disminuye el porcentaje de células silenciadas que migraron en un ensayo de *transwell*. Asimismo, promueve el aumento de la adhesión en las células HTR8/SVneo.
- ✓ Incrementa en las células trofoblásticas JEG-3 y BeWo, la expresión de marcadores de diferenciación bioquímica (β hCG y sincitina-1) favoreciendo la formación de estructuras tipo sinciciales.

IV. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON StarD7

Como una aproximación al conocimiento de la función de StarD7, se planteó establecer sus posibles interacciones con otras proteínas intracelulares a través de ensayos de interacción proteína-proteína, los cuales proporcionan una información muy valiosa. Para tal fin, a través de una pasantía en el laboratorio del Dr. Eric Bennett en la Universidad de California en San Diego- USA (UCSD), se realizó un análisis de proteínas mediante cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrómetros de masa en tándem (LC-MS-MS), herramienta usualmente utilizada para llevar a cabo el objetivo planteado. La técnica de LC-MS-MS utiliza detectores espectrométricos multi-masas que potencialmente permiten medir un amplio rango de analitos sin limitaciones de masa molecular (Sulyok et al., 2006). Las principales ventajas incluyen el bajo límite de detección, la posibilidad de generar información estructural, requerimientos mínimos de preparación de las muestras, entre otras (Steen et al., 2004).

4.1. Líneas celulares estables que sobre-expresan StarD7

Inicialmente se realizaron cultivos de líneas celulares transfectadas establemente con plásmidos que expresan StarD7 asociado al “epítope” de hemoaglutinina (HA), para lo cual, se utilizaron las siguientes construcciones creadas en el laboratorio a través del sistema Gateway (Invitrogen):

- StarD7I HA (pDEST-CTAP): tiene insertado el gen que codifica a la isoforma de StarD7 precursora, de aproximadamente 43 kDa, unida a HA en la región C-terminal.

- StarD7II HA-C (pDEST-CTAP) y StarD7II HA-N (pDEST-NTAP): tiene insertado el gen que codifica a la isoforma de StarD7 madura (de 35 kDa) unida a HA en la región C-terminal y N-terminal, respectivamente.

Se utilizaron las líneas celulares epiteliales HEK-293T (*Human Embryonic Kidney*) y HeLa (*Human cervix adenocarcinoma*), las cuales se transfectaron establemente a través de la infección lentiviral, (ver Materiales y Métodos). La expresión de la proteína StarD7-HA se corroboró por *western blot* e Inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-HA monoclonal.

La Figura 36 A muestra un ensayo de *western blot* en el cual se observaron las bandas proteicas correspondientes a ambas isoformas de la proteína StarD7 unida al epítipo HA: StarD7I (~43 KDa) y StarD7II (~35 KDa). Adicionalmente, se realizó el análisis de la sobre-expresión de las isoformas de la proteína StarD7 mediante microscopía confocal utilizando el anticuerpo monoclonal anti-HA. En la Figura 36 B se observa la localización citoplasmática de la proteína StarD7-HA, en donde se muestra un perfil retículo-vesicular con mayor expresión perinuclear concordante con resultados previos del laboratorio (Angeletti et al., 2008).

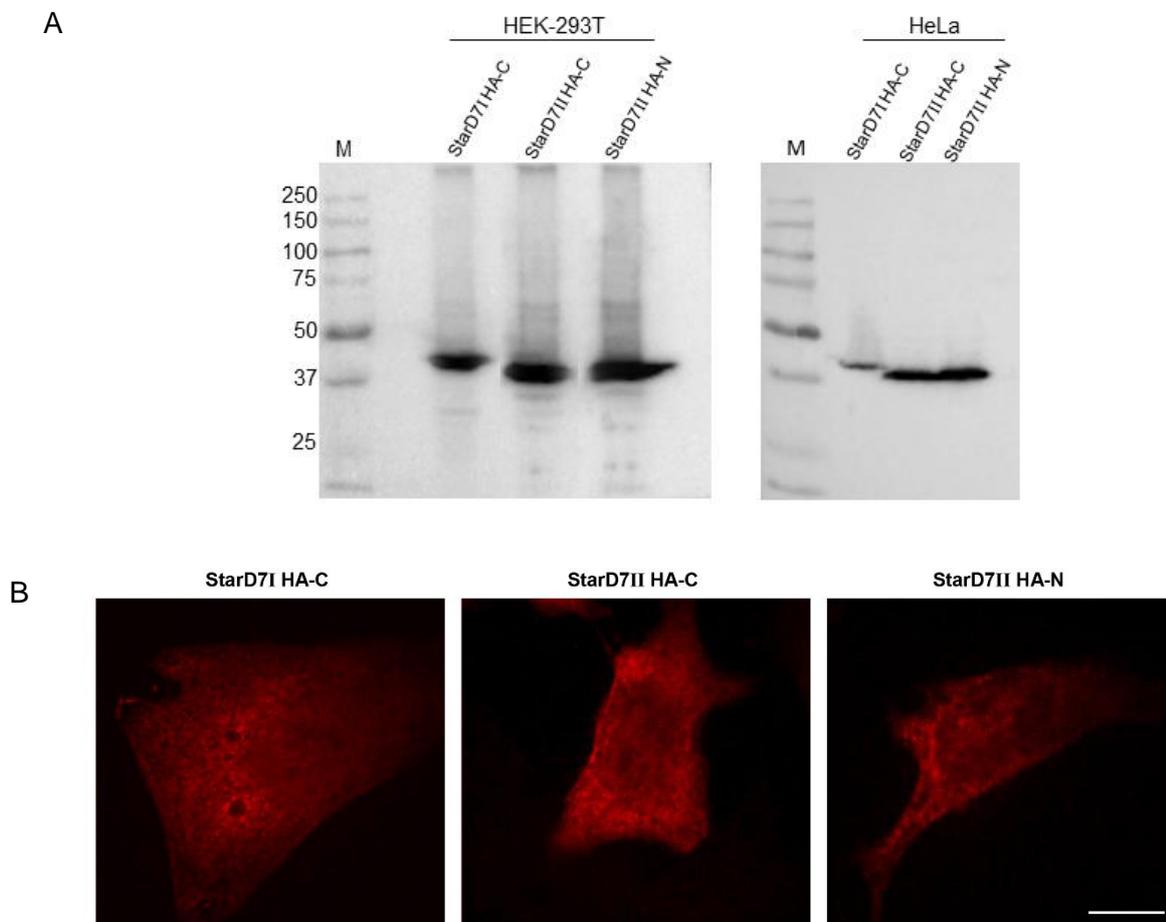


Figura 36. A) Expresión de la proteína StarD7-HA en células HeLa (izquierda) y células HEK-293T (derecha) transfectadas establemente con las construcciones StarD7I HA-C, StarD7II HA-C, y StarD7II HA-N. Los extractos celulares (50 μ g/carril) fueron analizados mediante *western blot*. Las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA. M: marcador de peso molecular.

B) Detección por inmunofluorescencia de StarD7. Se muestran imágenes de células HeLa establemente transfectadas con StarD7-HA detectadas por microscopía confocal. Los vidrios se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA (rojo). Se muestran imágenes representativas ampliadas de células transfectadas con las diferentes construcciones (600X, barra= 5 μ m).

4.2. Ensayos de inmunoprecipitación/ LC-MS-MS

A los fines de identificar las posibles proteínas que interaccionan con la proteína StarD7 mediante LC-MS-MS, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) con extractos proteicos de la línea celular HEK-293T establemente transfectadas con las construcciones que expresan StarD7I/II-HA. Los extractos se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA covalentemente unido a agarosa y la especificidad de la inmunoprecipitación se controló mediante un ensayo de *western blot* (Fig. 37).

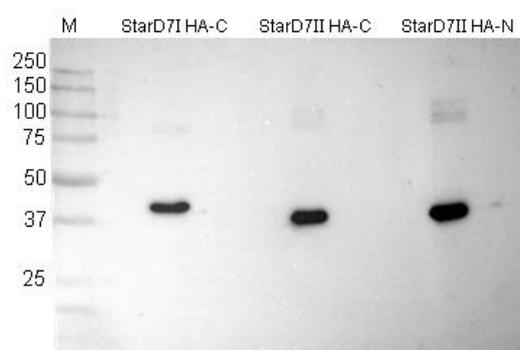


Figura 37. Ensayo de *western blot* de los extractos de proteínas inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-HA de células HEK-293T transfectadas establemente con las construcciones: StarD7I HA-C, StarD7II HA-C, y StarD7II HA-N. Las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA. M: marcador de peso molecular.

Para realizar el análisis por espectrometría de masa, las proteínas que interaccionaron con la resina de agarosa-anti-HA se eluyeron con un péptido HA y se procesaron siguiendo un protocolo estandarizado - ver Materiales y Métodos.

El análisis de los resultados obtenidos se realizó con el algoritmo CompPASS (PMID: 19615732) para filtrar las proteínas de unión no específica a StarD7 y posterior comparación de estas corridas a una base de datos que incluye todos los experimentos de IP-MS realizados en el laboratorio.

Las corridas de LC-MS-MS de cada muestra se compararon en una tabla de datos (Tabla III). Para la interpretación de los datos se debe considerar el estadístico *WDN_score* como el de mayor significancia. Cuando a una dada proteína le corresponde un valor de *WDN_score* igual o mayor a 1 se considera a esa proteína de "interacción específica". El valor "*Ratio*" de la última columna indica el número de veces que la proteína se identificó en toda

la base de datos en relación al *background* (58 corridas en total, en este caso) y cuanto mayor sea la relación, la proteína es menos específica.

Del análisis de los datos (Tabla III) se desprende que la proteína StarD7 interactúa con *ubiquitin ligasas tipo Cullin 3* (Cul3) y proteínas adaptadoras de Cul3 con dominios KLHL, BTB o KELCH. Estas proteínas están altamente conservadas entre las especies y desempeñan principalmente un papel fundamental en la modificación postraducciona de proteínas, como la ubiquitinación.

Adicionalmente, la Tabla III indica que StarD7 interactúa con proteínas GW182 (TNRC6A, B y C) del complejo argonauta, sugiriendo que StarD7 podría ser un componente de la maquinaria de silenciamiento celular.

Otro resultado arrojado por estos experimentos señala a Sec24B como una posible proteína de interacción con StarD7. Las proteínas Sec23/Sec24 son las responsables de capturar el “carga” en las vesículas nacientes en el transporte vesicular de moléculas COPII (Townley et al., 2008) por lo que resulta atrayente validar dicha interacción ya que se relaciona a los resultados mostrados anteriormente (Sección 2, inciso 2).

Estos hallazgos requieren ser validados por otras metodologías y se espera que estos estudios aporten nuevos elementos que contribuyan a la comprensión de la función de StarD7 en la fisiología celular, y permitan abrir nuevas estrategias para próximos estudios.

Como conclusión obtenida a través de los experimentos de LC-MS-MS se desprende que:

- ✓ StarD7 interactuaría con proteínas ubiquitin ligasas tipo Cul3 y proteínas adaptadoras de Cul3 con dominios KLHL, BTB o KELCH.
- ✓ StarD7 interactuaría con el complejo argonauta, ya que se encontró asociada a las proteínas GW182 (TNRC6A, B y C).
- ✓ Sec24B podría ser una posible proteína de interacción con StarD7

Tabla III. Resultados obtenidos mediante LC-MS-MS a partir de extractos proteicos de la línea celular HEK-293T establemente transfectadas con las construcciones que expresan StarD7I/II-HA. Se muestran los datos obtenidos para las primeras 20 proteínas. Un valor “WDN_score” mayor o igual a 1 sugiere interacción específica (en recuadro).

StarD7I HA-C									
GeneID	Symbol	Database ID	Ave.APSM	SN Score	WSN Score	DN Score	WDN Score	Z score	Ratio
56910	STARD7	sp Q9NQZ5 STAR7_HUMAN	619	16,77	15,98	24,88	24,88	7,48	1/58
23112	TNRC6B	sp Q9UPQ9 TNRC6B_HUMAN	42	4,37	4,16	6,48	6,48	7,49	1/58
26523	EIF2C1	sp Q9UL18 AGO1_HUMAN	9	2,02	1,93	3	3	7,49	1/58
90293	KLHL13	sp Q9P2N7 KLHL13_HUMAN	5	1,51	1,44	2,24	2,24	7,44	1/58
8452	CUL3	sp Q13618 CUL3_HUMAN	62	1,77	2,64	0,87	2,15	7,46	9/58
57130	ATP13A1	sp Q9HD20 AT131_HUMAN	4	1,35	1,28	2	2	7,42	1/58
57542	KLHDC5	sp Q9P2K6 KLDC5_HUMAN	4	1,35	1,28	2	2	7,42	1/58
8289	ARID1A	sp O14497 ARI1A_HUMAN	3	1,17	1,11	1,73	1,73	7,56	1/58
197322	ACSF3	sp Q4G176 ACSF3_HUMAN	3	1,17	1,11	1,73	1,73	7,56	1/58
27161	EIF2C2	sp Q9UKV8 AGO2_HUMAN	21	1,54	1,8	1,15	1,71	7,42	4/58
192669	EIF2C3	sp Q9H9G7 AGO3_HUMAN	9	1,43	1,45	1,5	1,7	7,42	2/58
55217	TMLHE	sp Q9NVH6 TMLH_HUMAN	2	0,95	0,91	1,41	1,41	7,58	1/58
57690	TNRC6C	sp Q9HCJ0 TNRC6C_HUMAN	2	0,95	0,91	1,41	1,41	7,58	1/58
80308	FLAD1	sp Q8NFF5 FAD1_HUMAN	2	0,95	0,91	1,41	1,41	7,58	1/58
9530	BAG4	sp O95429 BAG4_HUMAN	7	1,03	1,05	0,88	1,01	7,35	3/58
56171	DNAH7	sp Q8WXX0 DYH7_HUMAN	1	0,67	0,64	1	1	7,54	1/58
2879	GPX4	sp P36969 GPX4_HUMAN	1	0,67	0,64	1	1	7,54	1/58
2017	CTTN	sp Q14247 SRC8_HUMAN	7	1,03	0,98	0,88	0,88	6,66	3/58
10427	SEC24B	sp O95487 SC24B_HUMAN	3	0,83	0,79	0,87	0,87	7,15	2/58
StarD7II HA-N									
GeneID	Symbol	Database ID	Ave.APSM	SN Score	WSN Score	DN Score	WDN Score	Z score	Ratio
56910	STARD7	sp Q9NQZ5 STAR7_HUMAN	391	13,33	12,76	19,77	19,77	7,48	1/58
23112	TNRC6B	sp Q9UPQ9 TNRC6B_HUMAN	31	3,75	3,59	5,57	5,57	7,49	1/58
26523	EIF2C1	sp Q9UL18 AGO1_HUMAN	7	1,78	1,71	2,65	2,65	7,48	1/58
57542	KLHDC5	sp Q9P2K6 KLDC5_HUMAN	6	1,65	1,58	2,45	2,45	7,47	1/58
8452	CUL3	sp Q13618 CUL3_HUMAN	65	1,81	2,73	0,9	2,22	7,46	9/58
192669	EIF2C3	sp Q9H9G7 AGO3_HUMAN	8	1,35	1,35	1,41	1,56	7,4	2/58
57130	ATP13A1	sp Q9HD20 AT131_HUMAN	2	0,95	0,91	1,41	1,41	7,58	1/58
2273	FHL1	sp Q13642 FHL1_HUMAN	2	0,95	0,91	1,41	1,41	7,58	1/58
56171	DNAH7	sp Q8WXX0 DYH7_HUMAN	2	0,95	0,91	1,41	1,41	7,58	1/58
27161	EIF2C2	sp Q9UKV8 AGO2_HUMAN	15	1,31	1,45	0,97	1,3	7,33	4/58
57639	CCDC146	sp Q8IYE0 CC146_HUMAN	1	0,67	0,65	1	1	7,54	1/58
8289	ARID1A	sp O14497 ARI1A_HUMAN	1	0,67	0,65	1	1	7,54	1/58
10427	SEC24B	sp O95487 SC24B_HUMAN	4	0,95	0,91	1	1	7,24	2/58
9472	AKAP6	sp Q13023 AKAP6_HUMAN	1	0,67	0,65	1	1	7,54	1/58
6601	SMARCC2	sp Q8TAQ2 SMRC2_HUMAN	1	0,67	0,65	1	1	7,54	1/58
137902	PXDNL	sp A1KZ92 PXDNL_HUMAN	1	0,67	0,65	1	1	7,54	1/58
2017	CTTN	sp Q14247 SRC8_HUMAN	5	0,87	0,83	0,75	0,75	6,04	3/58
9530	BAG4	sp O95429 BAG4_HUMAN	5	0,87	0,83	0,75	0,75	7,18	3/58
1399	CRKL	sp P46109 CRKL_HUMAN	2	0,67	0,65	0,71	0,71	6,72	2/58

DISCUSIÓN

StarD7 pertenece a la superfamilia de proteínas de transferencia de lípidos relacionadas a la proteína StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*), las cuales se caracterizan por poseer un dominio globular denominado dominio START, que está implicado en la unión de lípidos/esteroles (Tsujiyama et al., 2000). Las mismas participan en funciones importantes como el metabolismo, transporte y señalización intracelular de lípidos, asociadas a patologías tales como fertilidad, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes y cáncer, constituyendo potenciales blancos de drogas terapéuticas (Alpy et al., 2014).

El transcripto de StarD7 fue inicialmente identificado en nuestro laboratorio mediante el análisis de expresión diferencial de genes, y se encontraba sobre-expresado en la línea celular de coriocarcinoma JEG-3 en comparación a muestras de tejidos trofoblásticos normales o tumores benignos. Es un gen ubicuo, con elevados niveles de expresión en varias líneas celulares epiteliales (Durand et al., 2004). Genes ortólogos a StarD7 humano se han anotado en las bases de datos GenBank y Ensembl en diferentes genomas, lo que sugiere **una función fisiológica importante**. Recientemente, se ha reportado una proteína similar a StarD7 humana en *Plasmodium falciparum* que participaría en la interacción con el huésped (van Ooij et al., 2013).

A partir de la información acumulada en relación a las características estructurales de la proteína transportadora de lípidos StarD7 y de su promotor (ver sección de introducción: “La proteína StarD7”) se propuso en este trabajo de tesis investigar el efecto de la depleción de StarD7 en diferentes aspectos celulares y moleculares, con el fin de conocer la **función de la proteína StarD7**. Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis se discuten a continuación:

I. Efecto del silenciamiento de StarD7 en la expresión de genes

La estrategia del silenciamiento a través de ARN de interferencia (siRNA), permitió reducir significativamente la expresión endógena de StarD7 e identificar a nivel celular las consecuencias funcionales.

En primer lugar, se demostró mediante un ensayo de microarreglos de oligonucleótidos realizado en células JEG-3, una alteración en la expresión de 89

transcriptos, de los cuales fueron seleccionados y validados los siguientes: Cnx43, TWIST1, MBD2, TGF β RII, ABCG2, THSD7A, SMURF2, KDELC1 y NID1 en su mayoría por encontrarse asociados al señalamiento Wnt/ β -catenina al igual que StarD7 (Dong et al., 2007; Phesse et al., 2008; Samarzija et al., 2009; Wu et al., 2009; Spee et al., 2010).

Dado que ABCG2 participa en una multiplicidad de eventos celulares fue seleccionado para los estudios subsiguientes.

ABCG2 codifica para un transportador de xenobióticos/lípidos también denominado BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*). Esta proteína es un miembro de la superfamilia de transportadores de eflujo de unión a ATP situada en la membrana apical de las células epiteliales de tejidos humanos normales, en particular altamente expresada en aquellos con función de barrera tales como placenta, testículo, hígado, intestino, riñón, cerebro, entre otros (Stacy et al., 2013). ABCG2 interviene en el transporte de un gran número de moléculas como urato, ácido fólico, hormonas esteroideas, porfirinas, fosfolípidos y el grupo hemo (Kerr et al., 2011; Nakanishi et al., 2012).

La función biológica primaria de ABCG2 es proteger al organismo de xenobióticos, tóxicos, fármacos o cancerígenos, formando una barrera de defensa importante, así como una fuente de resistencia a los medicamentos utilizados en el tratamiento de tumores malignos, por ejemplo MTX (Noguchi et al., 2009; Nakanishi et al., 2012; Stacy et al., 2013). ABCG2 se sobre-expresa en tumores, líneas celulares tumorales y en una subpoblación de células madres que presentan resistencia a fármacos quimioterapéuticos y tóxicos xenobióticos denominada *side population cells* (Hu et al., 2008; Song et al., 2010). Esta mayor expresión se correlacionó con un mal pronóstico en una gran variedad de tumores (Nakanishi y Ross, 2012).

Los resultados de este trabajo de tesis indicaron que el silenciamiento de StarD7 afectó negativamente la expresión de ABCG2 en líneas celulares derivadas de placenta, hígado, colon y pulmón, la cual se acompañó con cambios en el fenotipo de resistencia a MTX. Así, las células silenciadas acumularon mayor cantidad de la droga anti-neoplásica siendo más susceptibles al tratamiento, con una disminución en la sobrevivencia celular. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores en células BeWo (Ee et al., 2004), HepG2 (Li et al., 2012), A549 (Chen et al., 2010), cáncer de mama (Ee et al., 2004; Li et al., 2005; Lv et al., 2007; Li et al., 2008; Li et al., 2012), una línea celular de carcinoma gástrico humano (Pribsch et al., 2006) y HEK293 (Hori et al., 2005) quienes demostraron

que la disminución de BCRP, mediante el tratamiento con siRNA, revierte la multirresistencia a drogas. Contrariamente, se observó que la sobre-expresión de la proteína StarD7 en células HepG2 aumentó los niveles proteicos de ABCG2, indicando que existe una correlación positiva entre los niveles de ambas proteínas.

II. Efecto del silenciamiento de StarD7 en la homeostasis intracelular

Como se mencionó, el transporte de lípidos y proteínas entre organelas es un proceso esencial en la organización de los diferentes compartimentos celulares. Diversos estudios indican que defectos en la cantidad, calidad y/o distribución de los lípidos intracelulares se asocian a una gran número de enfermedades humanas, tales como enfermedades cardiovasculares, obesidad, defectos metabólicos, preeclampsia, Alzheimer y cáncer (Prinz, 2010; Bexiga et al., 2013).

Estudios previos del laboratorio demostraron que StarD7 forma monocapas estables por adsorción en la interfase aire-buffer (Angeletti et al., 2004) indicando que StarD7 puede ser retenida en la interfase de la membrana lipídica, donde sufre una reorganización dependiente de lípidos (Angeletti et al., 2004). El mecanismo de interacción de StarD7 con la membrana lipídica ha sido dilucidado mediante diferentes aproximaciones experimentales sugiriendo que StarD7 favorece el transporte de lípidos entre membranas mediante procesos de hemifusión (Angeletti et al., 2011). Por otro lado, Horibata y Sugimoto informaron que StarD7 media la entrega de PC a la mitocondria (Horibata et al., 2010). Más recientemente, Haberkant y col. demostraron, mediante ensayos de interacción *in vivo* de lípidos fotoactivables con proteínas, que StarD7 sólo interactuaría con PC (Haberkant et al., 2013).

En consonancia con estos reportes que indican la participación de StarD7 en el transporte intracelular de lípidos, en este trabajo se demostró que el silenciamiento de StarD7 produjo una reducción en la biosíntesis de fosfolípidos totales sin afectar la relación entre los principales fosfolípidos celulares. Por lo tanto, es posible hipotetizar que la disminución de la biosíntesis de fosfolípidos observada sea compatible con un mecanismo compensatorio destinado a reducir su acumulación, como resultado de una disminución en su transporte entre organelas.

La reducción en la cantidad de fosfolípidos totales se acompañó con una clara ruptura de la estructura del aparato de Golgi, visualizada con el anticuerpo anti-giantina. El agregado de BFA a células silenciadas con siD7 produjo una mayor dispersión de la señal dada por la proteína giantina, residente del Golgi, recuperando después de los lavados la morfología inicial del aparato de Golgi. Estos resultados indican que el transporte retrógrado está preservado, mientras que existe dificultad para realizar el transporte anterógrado. Resultados similares han sido reportados para otras LTPs como P1TP y NIR2, cuya disminución produce fragmentación del complejo de Golgi comprometiendo, en este caso, el transporte retrógrado mediado por COPI (Litvak et al., 2002; Carvou et al., 2010). Estos hallazgos están avalados por estudios que indican que la depleción de fosfolípidos, en especial PC, afecta el tráfico de proteínas desde el RE al complejo de Golgi (Testerink et al., 2009; Sarri et al., 2011). Igualmente, la inhibición de la síntesis de PC resulta en una perturbación de la estructura del RE, provocando una acumulación de *lipid droplets* (Lagace et al., 2013).

Estos resultados están en consonancia con las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica que revelan que las células HepG2 tratadas con siRNA contra StarD7 muestran RE dilatado, desorden en el sistema de endomembranas y numerosas mitocondrias perinucleares, en su mayoría con morfología anormal. Además, se observó acumulación intracelular de lípidos y glucógeno, indicando una estrecha asociación entre la alteración en el metabolismo lipídico y la disminución de la expresión de StarD7.

Las alteraciones morfológicas y ultraestructurales descritas anteriormente son la resultante de una respuesta de estrés de RE. Se sabe que las alteraciones en el metabolismo de fosfolípidos, cambios en el estado redox y en los niveles de calcio intraluminal, la incapacidad para modificar post-traduccionalmente las proteínas, entre otros disturbios en la homeostasis intracelular, conducen a la activación de una respuesta de estrés de RE, denominada *Unfolded Protein Response* (UPR) (Fu et al., 2011). Consistente con estos datos, las células tratadas con siRNA contra StarD7, activaron una respuesta UPR, evidenciada por cambios en la expresión de las proteínas involucradas en sensar y señalar esta respuesta: IRE1 α , calnexina, PDI (*protein disulfide isomerase*), BiP/GRP78 y PERK. Se observó un aumento de las chaperonas calnexina y BiP/GRP78 en forma temprana (6 h) para retornar a valores normales entre las 24 y 48 h de silenciamiento, mientras que la quinasa PERK presentó un valor máximo a las 12 h de transfección con siD7. En relación a IRE1 α su

expresión aumentó a las 24 h de silenciamiento permaneciendo elevada a las 72 h post-silenciamiento, mientras que los niveles de PDI no mostraron importantes cambios en todos los tiempos ensayados. A las 72 h post-silenciamiento se observó disminución en los niveles de todas las proteínas excepto IRE1 α .

Coincidentemente con estos datos, el ensayo de *Microarray* y posterior validación mediante qRT-PCR reveló un aumento del transcripto KDELC-1 en las células silenciadas de StarD7. Interesantemente, este gen codifica para una proteína residente en el lumen del RE denominada EP58 (Kimata et al., 2000) que pertenece a la familia de proteínas que se unen al receptor KDEL del aparato de Golgi, originando un complejo ligando-receptor que retorna la proteína al RE. Proteínas residentes del RE como BiP y PDI contienen KDEL en la región C-terminal (Yamamoto et al., 2003).

En resumen, los resultados experimentales obtenidos sugieren que el silenciamiento de StarD7 genera una respuesta UPR, que intenta resolver el estrés de RE producido. Sin embargo, se advierte que de continuar el silenciamiento de StarD7 la célula podría ir a apoptosis y subsiguiente muerte celular. Al respecto, ensayos preliminares indicarían que a las 72 h post-silenciamiento no hubo modificación de PARP clivado ni caspasa 3, proteínas marcadoras de apoptosis celular (datos no mostrados).

Varios estudios señalan una estrecha relación entre la respuesta a estrés de RE y el estrés oxidativo (Higa et al., 2012). El estrés oxidativo y la generación de ROS son componentes integrales del estrés de RE y no son sólo consecuencias. Los principales componentes enzimáticos para la producción de ROS durante la inducción UPR son PDI, ERO-1 (*endoplasmic reticulum oxidoreductin*) y los complejos de NADPH oxidasa (especialmente Nox4) (Bhandary et al., 2012).

Las células tienen niveles basales de ROS necesarios para el funcionamiento y señalización normal, los cuales aumentan después de la exposición a agentes tóxicos, a contaminantes ambientales o durante las reacciones enzimáticas. El potencial de membrana mitocondrial interna produce el anión superóxido que se convierte en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la superóxido dismutasa mitocondrial y difunde hacia el citoplasma. El H₂O₂ forma, a través de la reacción de Fenton, el radical hidroxilo altamente reactivo. El anión radical superóxido también genera otros metabolitos tóxicos como el peroxinitrito, el ácido hipocloroso y oxígeno molecular.

En condiciones fisiológicas basales los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos endógenos (hemo-oxigenasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y tioredoxina reductasa), así como no enzimáticos (por ejemplo, vitaminas) evitan la acumulación de ROS. Además, varios sistemas como NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ y glutatión oxidado/reducido (GSSG/GSH) regulan la homeostasis redox (Bhandary et al., 2012). En relación a este punto, se demostró que el estrés del RE generado por el silenciamiento de StarD7 se acompañó con una mayor producción de ROS basal. Asimismo, cuando las células silenciadas fueron tratadas con 200 μM de H_2O_2 , se observó un incremento en la generación de ROS. Consecuentemente la viabilidad celular disminuyó con una mayor susceptibilidad a la injuria, revelando que la ausencia de StarD7 predispone a una mayor producción de ROS y aumento de estrés celular. Además, se demostró que el silenciamiento de StarD7 conlleva a un aumento en los niveles de la enzima antioxidante HO-1, la cual presenta propiedades vasodilatadoras, anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y otras características citoprotectoras, la cual intentaría neutralizar las ROS generadas (Levytska et al., 2013).

Estos resultados están de acuerdo con los datos reportados por Deuring y col. que muestran, en biopsias de colon de pacientes con enfermedad de Crohn, una correlación negativa entre los niveles de ABCG2 y GRP78 sugiriendo que la inflamación dependiente de la activación de la UPR es la responsable de la supresión de la función de ABCG2 (Deuring et al., 2012). En este sentido, los reportes de Shen y col. indican que ABCG2 ejerce un rol protector contra el estrés oxidativo disminuyendo la generación de ROS, mejorando la capacidad antioxidante, regulando el nivel de hemo intracelular, e inhibiendo la respuesta inflamatoria en células neuronales (Shen et al., 2010).

El mecanismo específico por el cual la depleción de StarD7 impacta en la expresión de ABCG2 es desconocido al presente. Sin embargo, puede estar relacionado a las alteraciones en la morfología de las mitocondrias y el RE. De hecho, se sabe que la proteína ABCG2 forma homodímeros en el RE, por lo tanto es necesario un plegamiento correcto para su funcionalidad (Nakagawa et al., 2009; Wakabayashi-Nakao et al., 2009). Por otra parte, un informe reciente muestra que hepatocitos deficientes en ABCG2 poseen mayor cantidad de mitocondrias fragmentadas acompañadas por interrupción en la dinámica y función mitocondrial (Lin et al., 2013) apoyando los cambios ultraestructurales observados en células HepG2 tratadas con siRNA contra StarD7.

Adicionalmente, este estudio revela por primera vez que la pérdida de la proteína StarD7 sensibiliza las células a los fármacos quimioterapéuticos, lo cual es compatible con las observaciones experimentales que demuestran que la expresión de StarD7 está involucrada en mantener la expresión de ABCG2, protegiendo así a las células del daño inducido por ROS. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de la expresión de StarD7 puede ser una estrategia adecuada contra la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia.

En resumen, los datos discutidos hasta aquí permiten concluir que la proteína StarD7 es requerida para mantener la homeostasis intracelular, ya que su disminución ocasiona disminución en la expresión de un conjunto de transcriptos, entre ellos ABCG2, reducción de la biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos, alteración de las estructuras subcelulares, produciendo aumento de ROS e induciendo una respuesta de estrés de RE.

III. Estudio del silenciamiento de StarD7 en diferentes procesos celulares

En esta parte del trabajo se demostró que el silenciamiento de StarD7 afecta los siguientes procesos celulares: proliferación, migración, adhesión y diferenciación. A través de ensayos de incorporación de BrdU y H³-timidina, se observó una significativa disminución en la proliferación en las células transfectadas con siD7 respecto al control. Además, se demostró mediante ensayos de *wound healing* y de *transwell*, en líneas celulares trofoblásticas y de hepatoma humano, una reducción significativa en la migración celular cuando se silenció la expresión de StarD7. Asimismo, se estableció una mayor adherencia a laminina en las células HTR8/SVneo depletadas de StarD7.

El impacto del silenciamiento de StarD7 en la diferenciación celular, se analizó en células de CTB velloso (CTBv). Los CTBv mononucleados proliferan, se diferencian y fusionan formando el STB, una capa continua y multinucleada, no proliferativa con función de barrera placentaria (Huppertz et al., 2006). Durante el proceso de diferenciación del CTBv son necesarios múltiples factores tales como las proteínas fusogénicas de membrana sincitina-1 y 2, conexina-43, caderina 11, la hormona gonadotrofina coriónica (hCG) y la hormona lactógeno placentaria humana, las proteínas PSG (*Pregnancy specific glycoproteins*) (Camolotto et al., 2010), actividad de metaloproteinasas y desintegrinas 12, factores de crecimiento (EGF, VEGF, TGFβ-1) así como la externalización de PS en la membrana plasmática, la activación de la caspasa 8 (Huppertz et al., 2008), y de varios factores y vías de

señalización, entre ellas las proteínas Wnt (Knofler et al., 2013; Nayeem et al., 2014). Los resultados obtenidos en relación a este punto indicaron que la depleción de StarD7 produjo fusión celular y expresión de marcadores bioquímicos de diferenciación en las células JEG-3 y BeWo, líneas celulares derivadas de trofoblasto comúnmente utilizadas para estudiar diferenciación y fusión celular. Se demostró incrementos en la expresión del ARNm, así como en la síntesis y secreción de la proteína β hCG, e inducción concomitante de los niveles endógenos del ARNm de sincitina-1, dos marcadores conocidos de sincialización. Este efecto se correlacionó con la aparición de células gigantes multinucleadas visualizadas mediante microscopía, evidenciando diferenciación morfológica.

Evseenko y col demostraron que la reducción de la expresión de ABCG2 en células BeWo por siRNA resultó en un incremento en la externalización de PS con acumulación de ceramida. Estos efectos fueron acompañados con una disminución de los ARNMs de β hCG y sincitina cuando las células fueron inducidas a diferenciar por el tratamiento con forskolin (Evseenko et al., 2007), resultados que aparecen de alguna manera en contradicción con los datos presentes. Aunque en ambos estudios hubo una disminución en los niveles de ABCG2, es importante destacar que en el presente trabajo la disminución de ABCG2 se logró después de la depleción de la expresión de StarD7. Además, las discrepancias observadas podrían entenderse teniendo en cuenta que el estudio de Evseenko se realizó en células BeWo inducidas a diferenciar mientras que en el presente estudio se emplearon células BeWo y JEG-3 sin diferenciar. Además, ambas líneas celulares poseen varias características diferentes tales como la actividad proliferativa, grado de diferenciación, la motilidad celular, la migración y la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo (Al-Nasiry et al., 2006; Burleigh et al., 2007; Prouillac et al., 2010).

Como se mencionó, se observó que el silenciamiento de StarD7 induce, en las líneas celulares de origen trofoblástico: fusión celular, aumento en la expresión de β hCG/sincitina-1 y disminución de la proliferación. En contraste, en el contexto de las células normales, los CTBv sufren sincialización espontánea *in vitro*, incrementando la expresión del mRNA y proteína de StarD7 (Angeletti et al., 2008). Estos datos sugieren que es necesario un nivel adecuado de StarD7 para la fisiología normal de la célula. Hay varios informes que apoyan esta hipótesis. En primer lugar, el transcripto StarD7 fue identificado originalmente incrementado en la línea celular derivada de coriocarcinoma JEG-3 con respecto a sus contrapartes no malignas: mola hidatiforme completa y el tejido trofoblástico normal

(Angeletti et al., 2008). El transcripto StarD7 fue uno de los 147 genes asociados específicamente a las células del tumor colorrectal (Wiese et al., 2007). Además, también se ha reportado inducción de StarD7 en la leucemia linfocítica crónica B (Jelinek et al., 2003) y en varias líneas celulares de cáncer (Wiese et al., 2007; Flores-Martin et al., 2013). Curiosamente, Ikeda y col encontraron que miR-193b inhibe la proliferación de células de cáncer pancreático correlacionado con la expresión de la transcripción de StarD7 blanco, efecto asociado a inhibición en la proliferación celular (Ikeda et al., 2011). Finalmente, se demostró que el promotor del gen StarD7 es activado por la señalización Wnt/ β -catenina (Rena et al., 2009), una vía que promueve la proliferación y con frecuencia se altera en las células cancerosas.

Estas consideraciones y el aumento de la síntesis y secreción de β hCG inducida por el silenciamiento de StarD7 observada están en consonancia con el hecho de que varias alteraciones en la función del STB se han asociado a la alta producción y secreción de β hCG (Vaitukaitis et al., 1976; Hsu et al., 1994; Kharfi et al., 2005). Por lo tanto, es posible hipotetizar que la desregulación de la expresión de StarD7 podría resultar en una alteración en la función y/o diferenciación del trofoblasto conduciendo a un mayor riesgo de trastornos placentarios.

Se desconoce el mecanismo específico por el cual el silenciamiento de StarD7 impacta sobre la migración celular y la proliferación celular. Sin embargo, puede estar relacionado a la reducción de la expresión de ABCG2. De hecho, varios informes vinculan las alteraciones en la expresión de ABCG2 con cambios en la migración, invasión y proliferación celular. En este sentido se reportó que la sobreexpresión de ABCG2 se correlaciona con mayor migración e invasión en una variedad de diferentes tipos de tumores (Okamoto et al., 2009; Tsai et al., 2011; Yin et al., 2011). Por el contrario, la inhibición de ABCG2 resultó en una falla en la migración y formación microvascular de células endoteliales humanas (Higashikuni et al., 2010) y también en la inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer (Chen et al., 2010). Además, se informó que hsa-miR-520H disminuye la expresión de ABCG2 conduciendo a las células de cáncer pancreático a una inhibición de la migración e invasión y en los niveles de las *side population cells* (Wang et al., 2010).

Aparte de su función en la protección celular y el transporte de drogas, ABCG2 y algunas otras proteínas ABC han sido implicadas en regular la asimetría de fosfolípidos

mediante el transporte de lípidos estructurales dentro de las membranas plasmática (Woehlecke et al., 2003; van Meer et al., 2006; Takabe et al., 2008; Samadi et al., 2011). Además, ABCG2 y ABCC1 participan en la secreción de S1P (Samadi et al., 2011). Por otro lado, se sabe que la actividad de ABCG2 es regulada por caveolina-1 a través de interacciones proteína-proteína y también por interacciones con micro-dominios de colesterol en la membrana plasmática (Telbisz et al., 2007; Herzog et al., 2010), resaltando la importancia del contenido, metabolismo y distribución de los lípidos celulares en la función de ABCG2.

La activación del metabolismo de los lípidos es un evento temprano en la carcinogénesis y una característica central de muchos cánceres (Hilvo et al., 2011; Santolla et al., 2012; Zhu et al., 2014). Por consiguiente, varias enzimas y factores de transcripción que controlan la homeostasis lipídica y la lipogénesis se sobreexpresan en cáncer. Recientemente, se ha reportado que la función y el metabolismo de los fosfoinositoles son controlados durante la tumorigénesis por una proteína de transferencia específica (Fayngerts et al., 2014). Adicionalmente, experimentos de silenciamiento de múltiples genes que regulan el metabolismo de lípidos condujo a una reducción en los perfiles lipidómicos y viabilidad de las células de cáncer de mama (Hilvo et al., 2011). Consistente con esta información, el silenciamiento de StarD7 condujo a la disminución en la síntesis de los fosfolípidos en células JEG-3 (Flores-Martin et al., 2012). Aunque no se encontraron modificaciones en el porcentaje de distribución de las principales especies de lípidos individuales en las células depletadas de StarD7 no se puede descartar un cambio en la cantidad de otros compuestos minoritarios o alteraciones en la localización subcelular de fosfolípidos particulares.

PC, el principal fosfolípido intracelular, se metaboliza a ácido fosfatídico que a su vez se convierte en ácido lisofosfatídico (LPA). LPA también puede conducir a la activación de esfingosina quinasa-1, que biotransforma esfingosina a S1P. LPA y S1P son señales de supervivencia que promueven la proliferación, migración y angiogénesis (Samadi et al., 2011). En este sentido, ha sido reportada una disminución en la concentración intracelular de esfingosina y esfingosina quinasa-1 durante la sincicialización del trofoblasto (Johnstone et al., 2005; Singh et al., 2012). Además, la adición de S1P a cultivos de CTB condujo a una reducción en la secreción de hCG (Johnstone et al., 2005).

En este escenario, aunque no medimos el nivel intracelular de S1P, es posible considerar que la disminución de la biosíntesis de fosfolípidos llevó a una disminución en la concentración de S1P que a su vez estimula el proceso de sincicialización y la regulación negativa de la proliferación y migración celular. Esta hipótesis y nuestros datos están en consonancia con la disminución en la incorporación de glicerol radiactivo en la biosíntesis *de novo* de triacilglicerol y fosfolípidos durante la diferenciación de cultivos de CTBs (Johnstone et al., 2005).

En resumen, este estudio revela que la pérdida de la proteína StarD7 en células trofoblásticas altera el nivel del transportador multidroga ABCG2, la migración celular, la proliferación celular y la expresión de marcadores de diferenciación proporcionando evidencias para un nuevo rol de StarD7 en fisiología celular de la placenta.

IV. Identificación de proteínas asociadas a StarD7

Las interacciones proteína-proteína son eventos esenciales para las funciones celulares. Identificar alteraciones de las interacciones proteicas celulares normales es vital para entender el proceso de la enfermedad y diseñar estrategias para controlarlas. Un avance importante en la investigación proteómica es el descubrimiento de interacciones proteína-proteína que controlan eventos moleculares que contribuyen a las funciones celulares críticas y a enfermedades humanas. Hay numerosos métodos para investigar las interacciones proteína-proteína. Cada una de las aproximaciones tiene sus fortalezas y debilidades, particularmente con respecto a la sensibilidad y especificidad del método.

En esta sección del trabajo se realizaron ensayos de inmunoprecipitación seguido de espectrometría de masa LC-MS-MS, como parte de una pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Eric Bennett de la Universidad de California en San Diego, USA (UCSD). Para lo cual, se realizaron cultivos de líneas celulares HEK-293T transfectadas establemente con plásmidos que expresan StarD7I y StarD7II asociadas al epítipo HA.

La técnica LC-MS-MS arrojó como resultado que la proteína StarD7 interactúa con ubiquitin ligasas tipo *Cullin-3* (Cul3) y proteínas adaptadoras de Cul3 con dominios KLHL, BTB o KELCH. *Cullins* son proteínas encargadas de la ubiquitinación, implicadas en procesos tales como la regulación del ciclo celular y de la homeostasis redox, relacionadas con

enfermedades degenerativas (Anderica-Romero et al., 2013; Metzger et al., 2013) y regulando el transporte intracelular (Hubner et al., 2012).

Otra importante interacción de StarD7 sugerida a partir de estos ensayos, fue con las proteínas que forman el complejo de la maquinaria de silenciamiento celular, particularmente se la encontró asociada a las proteínas GW182 (TNRC6A, B y C). Al respecto, se sabe que los miRNAs regulan cientos de procesos celulares, jugando un papel esencial en la célula (Braun et al., 2012). miRNAs han sido implicados en diferentes procesos biológicos como proliferación celular, diferenciación, metabolismo, embriogénesis, inflamación, muerte celular programada y envejecimiento (Bushati et al., 2007). Además, una sola molécula de miRNA puede regular la expresión de los múltiples ARNm, que a menudo participan en la misma vía, y un sólo ARNm puede ser regulado por múltiples miRNAs. Recientemente se reportó que la maquinaria de biogénesis de miRNAs está regulada por el estrés del RE a través de una intrincada red de señalamiento confirmando especificidad y selectividad a la UPR en forma dependiente del tejido o del estrés (Maurel et al., 2013). Esta información podría explicar la interacción sugerida por los ensayos de LC/MS/MS.

Recientemente, se ha reportado a StarD7 como una de las 25 nuevas proteínas que interactúan con la enzima *O*-GlcNAc transferase (OGT) (Deng et al., 2014). Esta enzima participa en la *O*-glicosilación de proteínas agregando *N*-acetil glucosamina. Este estudio sugiere que la proteína OGT puede jugar un rol importante en el transporte/localización de las proteínas y en la regulación transcripcional, apoyando los hallazgos obtenidos en este trabajo.

Si bien estos hallazgos requieren ser validados por otras metodologías, posiciona a la proteína StarD7 cumpliendo nuevos roles, e interaccionando con importantes factores que regulan la maquinaria celular. Además, permitiría entender por qué la depleción de la expresión de StarD7 impacta en la expresión de numerosos genes modificando eventos tan fundamentales para la actividad celular como proliferación, migración y diferenciación celular.

CONCLUSIONES

En síntesis, en el presente trabajo de tesis se concluye que la proteína transportadora de lípidos contribuye a mantener la homeostasis intracelular participando en los procesos fisiológicos fundamentales para la vida celular como proliferación, migración, adhesión y diferenciación. Estos hallazgos fueron confirmados en diferentes líneas epiteliales tanto de origen trofoblástico como no trofoblástico sugiriendo que StarD7 tiene un rol funcional conservado.

Además, los resultados obtenidos avalan la idea de que la expresión de la proteína StarD7 debe mantenerse en niveles estrictamente adecuados para preservar la fisiología normal de la célula ya que su reducción ocasiona alteración de estructuras subcelulares como RE y mitocondrias, produciendo aumento de ROS e induciendo una respuesta de estrés de RE. Estas alteraciones se acompañan con reducción en la biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos y disminución en la expresión de un conjunto de transcriptos, entre ellos ABCG2, todos ellos impactando en los procesos de proliferación, migración, adhesión y diferenciación celular. Por el contrario, el incremento de StarD7 ha sido reportado en un gran número de estudios utilizando diferentes modelos de cáncer (Flores-Martin et al., 2013; Nayeem et al., 2014).

Finalmente, los datos obtenidos mediante LC/MS/MS sugieren que proteínas que participan en los complejos de ubiquitinación y silenciamiento celular interaccionarían con StarD7, indicando la posible participación de StarD7 en estos procesos.

En conjunto estos hallazgos permiten hipotetizar que StarD7 es un factor de supervivencia celular, sugiriendo que la inhibición de su expresión puede ser una estrategia adecuada contra la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia.

Avances futuros contribuirán a determinar los mecanismos moleculares que gobiernan la participación de StarD7 en los procesos descritos así como su papel en el desarrollo de la gestación, de enfermedades trofoblásticas gestacionales y de la tumorigénesis.

El siguiente esquema resume los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis (Fig. 38).

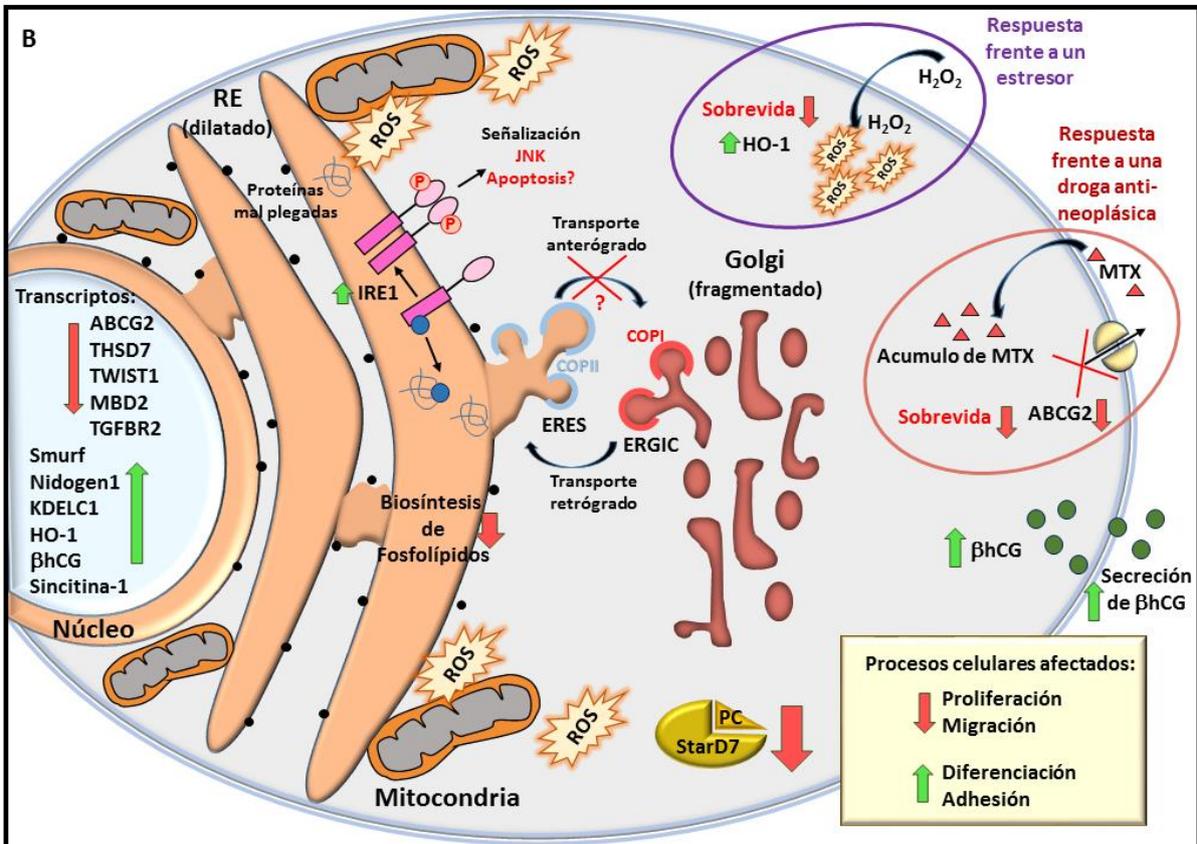
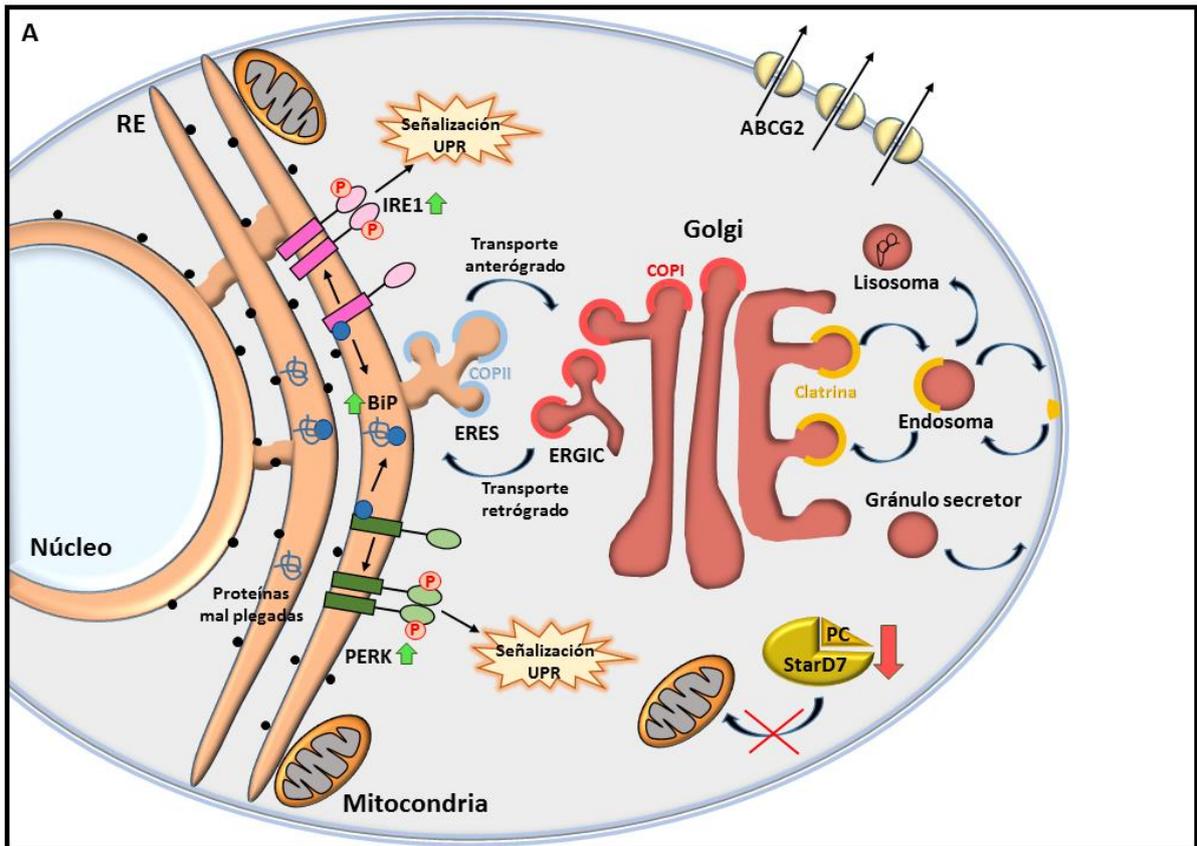


Figura 38. Representación gráfica del efecto de la depleción de StarD7. A) El silenciamiento de la proteína transportadora de fosfatidilcolina (PC) StarD7 genera tempranamente (entre las 6-24 h post-silenciamiento) estrés del RE iniciando una respuesta de proteínas mal plegadas (UPR). La UPR es mediada por tres proteínas transmembranas residentes en el RE que sensan el estrés de RE (PERK, IRE1 α y ATF6 (ver explicación Introducción pag. 41). Las tres proteínas transmembranas residentes del RE sensan el estrés del RE a través de BiP/Grp78. **B)** Efecto de la depleción de StarD7 entre las 48 y 72 h de tratamiento. El estrés del RE mediado por el silenciamiento de StarD7 conduce a dilatación del RE, alteración morfológica de las mitocondrias, fragmentación del aparato de Golgi, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), aumento de hemo oxigenasa-1 (HO-1), reducción en la biosíntesis de fosfolípidos, disminución en la proliferación y migración celular, aumento en la adhesión y diferenciación celular. Esta respuesta se acompañó con alteración global en la expresión de transcritos: ABCG2, THSD7, TWIST1, MBD2, TGFRB2, Smurf, Nidogen1, KDELC1, Sincitina-1, β hCG. En círculos se representan las respuestas observadas frente a un estresor como H₂O₂ y frente al tratamiento con la droga anti-neoplásica mitoxantrona (MTX). (? : indica posibles alteraciones no medidas).

MATERIALES

Y

MÉTODOS

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Construcción de plásmidos recombinantes

Para el clonado de las construcciones StarD7I/II-HA se utilizó el sistema *Gateway Technology (Invitrogen)*, es una tecnología universal para clonar secuencias de ADN para el análisis funcional y de expresión en múltiples sistemas. Esta tecnología utiliza el sistema de recombinación lambda el cual facilita la transferencia de secuencias de ADN heterólogo (flanqueado por sitios att modificados) entre vectores (Hartley et al., 2000). Dos reacciones de recombinación constituyen la base de este sistema: La enzima *Gateway® LR Clonase®* cataliza la recombinación “in vitro” entre un clon “entry” (conteniendo el gen de interés flanqueado por los sitios attL) y un vector de destino (conteniendo los sitios attR) para generar un clon de expresión. La enzima *Gateway® BP Clonase®* cataliza la recombinación “in vitro” entre un producto de PCR conteniendo los sitios attB (o un vector de expresión conteniendo los sitios attB) y un vector *donor* (conteniendo los sitios attP) para generar un vector “entry” conteniendo los sitios attL. La Figura 39 muestra un esquema de las reacciones BP y LR.

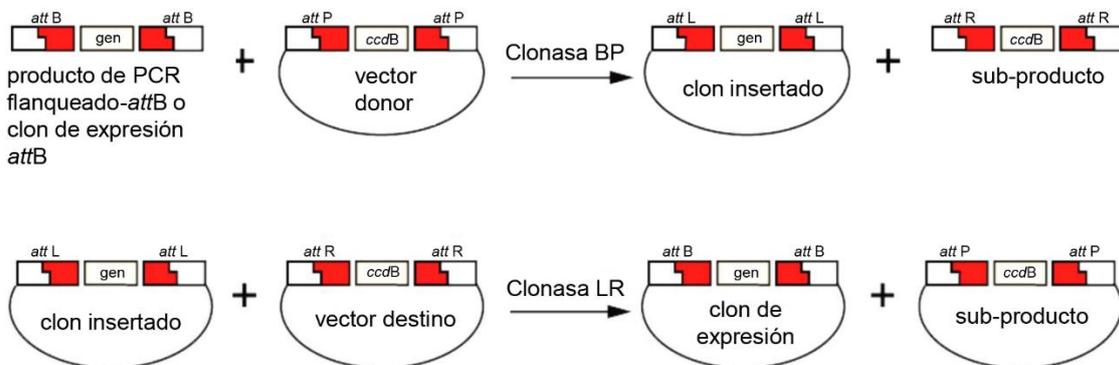


Figura 39. Esquema de las reacciones de recombinación que constituyen la base del sistema *Gateway® Technology (Invitrogen)*: Reacciones BP (arriba) y LR (abajo).

Estas construcciones se obtuvieron durante la pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Eric Bennett en la Universidad de California en San Diego- USA (UCSD). En el laboratorio se disponía de los vectores p-ENTR conteniendo la secuencia que codifica a la proteína StarD7II (isoforma madura) y el vector p-DONR conteniendo la secuencia que codifica a la

proteína precursora StarD7I (conteniendo un codón stop al final de la secuencia). A los fines de poder disponer de ambas secuencias unidas a un epítotope de histidina (HA) para realizar con ellos líneas celulares estables que sobre-expresen StarD7I-HA y StarD7II-HA se realizó la siguiente estrategia:

Reacción LR: en un tubo eppendorf se agregó: 1 μ l de buffer LR 5X, 1 μ l de la enzima *Clonasa LR*, 1 μ l del plásmido pDEST-C (para clonar StarD7I) o pDEST-N (para clonar StarD7II), 1 μ l de StarD7I-pDONR o StarD7II-pENTR y 1 μ l de H₂O, la mezcla se incubó 1 h a temperatura ambiente (TA). Como se mencionó, StarD7II contenía un codón stop al final de la secuencia, por lo que el epítotope HA debió agregarse en la región N-terminal (pDEST-N).

Para transformar las bacterias *E. coli* competentes, se colocó toda la mezcla de reacción junto con 50 μ l de bacterias en un tubo en hielo 5 min, luego se calentó a 42°C 1 min y se volvió a dejar en hielo 1 min. Se agregó 1 ml de LB (medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani) y se incubó 1 h con agitación a 37°C. La mezcla de transformación se centrifugó y un volumen menor se sembró en placas de Petri conteniendo LB-carbamazepina (100 μ g/ml). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Al otro día, se eligieron 2-3 colonias y se dejaron crecer durante la noche en 5 ml de LB-carbamazepina (100 μ g/ml). Por último, se purificaron los plásmidos utilizando el kit miniprep de Qiagen y se realizaron digestiones con enzimas de restricción que cortan tanto dentro del gen de interés, como en el esqueleto del plásmido, para confirmar la recombinación adecuada en el vector pDEST. Para tal fin, utilizando el programa *Serial Cloner* 2.6, se eligieron las enzimas: EcoRI y BamHI

Para obtener la construcción StarD7II con el epítotope HA en la región C-terminal, se construyeron *primers* para mutar el codón stop de StarD7 en el plásmido p-ENTR, a través de un reacción de PCR. Se utilizó la enzima *KOD polimerasa* (Novagen). El protocolo de amplificación incluyó: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg a 45°C, 20 seg a 70°C y un ciclo de 180 seg a 70°C. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron utilizando *SYBR safe*. La banda del tamaño deseado (aprox. 900 pb) se cortó del gel y se purificó mediante el kit de Qiagen.

El fragmento de ADN purificado, producto de la PCR, se insertó en el vector p-DONR, mediante la reacción BP agregando: 2 μ l de buffer BP 5X, 1 μ l de la enzima *Clonasa BP*, 2 μ l del fragmento purificado, 1 μ l del vector pDONR y 4 μ l de H₂O, la mezcla se incubó toda la noche a temperatura ambiente (TA) y una alícuota de esta mezcla se utilizó para transformar

bacterias *E. coli* competentes. Posteriormente, el plásmido se purificó y se utilizó para realizar la reacción LR, obteniendo el vector StarD7II-HA (pDEST-C). Para confirmar la construcción correcta, se realizaron digestiones enzimáticas y el plásmido de interés fue finalmente secuenciado. Los vectores obtenidos fueron:

- StarD7I HA-C (pDEST-CTAP): conteniendo la isoforma de StarD7 precursora unida a HA en la región C-terminal.

-StarD7II HA-C (pDEST-CTAP) y StarD7II HA-N (pDEST-NTAP): conteniendo la isoforma de StarD7 madura (de menor tamaño molecular) unida a HA en la región C-terminal y N-terminal, respectivamente.

Purificación de ARN total de células eucariotas en cultivo

Las células crecidas en placas de 6 pocillos se lavaron dos veces con PBS 1X (solución salina de fosfatos) y se recogieron en 0,75 ml de TRIZOL (Invitrogen). A la suspensión de células se le agregó 0,15 ml de cloroformo y luego de 15 min de reposo a TA, se centrifugó 15 min a 12000 x g, (4°C). La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y el ARN se precipitó con 0,37 ml de isopropanol 10 min a TA. El pellet obtenido se centrifugó a 12000 x g 10 min (4°C) y se lavó con etanol 75% v/v. El ARN precipitado se secó a TA y se resuspendió en agua libre de ARNasas (GIBCO). La cuantificación del ARN se obtuvo mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, sabiendo que 1 DO₂₆₀ equivale a 40 µg/ml de ARN. La pureza se evaluó mediante la relación de absorbancias obtenida a 260 nm *versus* a 280 nm leídas en el espectrofotómetro Shimadzu (UV/vis) o lector de multiplacas Biotek, considerándose valores aceptables entre 1,8 y 2. Finalmente las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Reacción de Transcriptasa Reversa

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN purificado en un volumen final de 20 µl. Alícuotas conteniendo 1 µg de ARN se incubaron con 1 U/µl de RNasin (Promega), inhibidor de ARNasas, 2 µl de buffer de reacción 1X (Tris-HCl -pH 8,3- 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 12,5 pmoles/µl de una mezcla de hexadesoxinucleótidos de secuencias al azar (iniciadores de la transcriptasa reversa), DTT (10 mM) y H₂O. La mezcla se incubó a 65°C

durante 15 min para destruir estructuras secundarias. Posteriormente se agregaron dNTPs 1 mM y la enzima M-MLV transcriptasa reversa 10 U/ μ l (Invitrogen) y se incubó 10 min a 25°C y luego 50 min a 37°C. Finalmente se inactivó la reacción incubando a 95°C durante 3 min.

Semi-cuantificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los fragmentos de ADNc sintetizados por la reacción de la transcriptasa reversa se amplificaron por PCR. El número de ciclos utilizados se optimizó para que la amplificación de los transcriptos se encontrase en el rango lineal. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron utilizando SYBR safe.

El protocolo de amplificación para GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) incluyó: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 22-24 ciclos (dependiendo de la abundancia del transcripto a amplificar) de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 30 seg a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C. La secuencia (5' - 3') de oligonucleótidos empleados para amplificar GAPDH es: sense, GGT GAA GGT CGG AGTC AAC G antisense: GAT CTC GCT CCT GGA AGA TGG.

PCR en tiempo real

Los transcriptos se cuantificaron por la técnica de PCR en tiempo real (ABI 7500, Applied Biosystems) con el software de detección v1.4. Los experimentos se realizaron usando SYBRGreen PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems) y los *primers* se agregaron a un volumen final de 15 μ l. Las condiciones de ciclado incluyeron un ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. La especificidad se verificó por el análisis de las curvas de *melting*. Cada muestra se analizó por triplicado y los niveles de transcriptos se normalizaron con ciclofilina A, calculando los niveles de expresión relativa con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La eficiencia de amplificación de los productos de PCR fue cercana al 98%. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar cada transcripto y la concentración de los mismos se muestran en la Tabla IV del anexo.

Preparación de extractos proteicos totales para ensayos de *western blot*

Para obtener los lisados celulares totales, se colocaron en placas de 6 pocillos 2×10^5 células/pocillo conteniendo 2 ml de medio de cultivo. Las células a recoger se lavaron 2 veces con PBS 1X, se suspendieron en 150 μ l de buffer Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 10%, dodecilsulfato sódico 2%, 2-mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,002%) y se sonicaron 20 segundos a 40% de amplitud. Los lisados celulares se hirvieron durante 5 min a 95°C y se centrifugaron a 10.000 x g a 4°C durante 10 min. Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Medición de la síntesis *de novo* de glicerofosfolípidos

La incorporación de ^3H -glicerol en los fosfolípidos se evaluó en células transfectadas con siRNA contra StarD7 o *scrambled* después de 48 h de transfección incubándolas con [^3H] -glicerol (2 Ci/pocillo; actividad específica: 200 mCi/mmol) durante 3 h. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS frío 1X, se resuspendieron en 1 ml de agua y se precipitaron con el mismo volumen de ácido tricloroacético (TCA) 10% y ácido fosfotúngstico (APT) 1%. Después de la centrifugación (800 xg, 15 min), la fracción sobrenadante se descartó. Los sedimentos se lavaron tres veces con TCA 5% - APT 0,5% y una vez con agua, mediante resuspensión y centrifugaciones sucesivas. Los fosfolípidos se extrajeron con cloroformo/metanol (2:1 v/v), y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. El contenido de proteínas en las preparaciones celulares se estimó por la técnica de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Los fosfolípidos individuales se separaron mediante cromatografía en capa fina utilizando sílica gel 60G. Se utilizaron estándares a fin de visualizar mediante vapores de yodo las correspondientes especies de lípidos individuales marcadas, se levantaron de la placa de sílice y la radiactividad en cada uno de los lípidos se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Microarreglos de oligonucleótidos

El ensayo se realizó en forma comparativa utilizando ARN de células JEG-3 tratadas durante 48 h con 200 nM de siD7 y siC. Se utilizó el servicio técnico del Laboratorio de

Diagnóstico Molecular de *Virginia Commonwealth University* (USA), en donde se procesaron y analizaron las muestras mediante el uso de plataformas de oligonucleótidos de ADN (Affymetrix). La identificación de la expresión de los genes alterados en ambas condiciones se evaluó mediante el método de significancia (S-score).

MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

Cultivo de líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares epiteliales utilizadas en este trabajo de tesis fueron las siguientes:

- Células trofoblásticas JEG-3 y BeWo (ATCC) derivadas de coriocarcinoma humano con características fusogénicas.
- Células HTR8/SVneo derivadas de CTBs humano de origen extravelloso invasivo provistas por el Dr. Charles Graham, Queen's University, Canadá.
- Otras células epiteliales: HepG2 (hepatoblastoma humano), HT-29 (adenocarcinoma colorectal humano), A549 (carcinoma pulmonar humano), HEK-293T (Human Embryonic Kidney) y HeLa (Human cervix adenocarcinoma)(ATCC).

Las células JEG-3, HepG2, HT-29, A549, HEK-293T y HeLa se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), mientras que las células BeWo y HTR8/SVneo se cultivaron en DMEM/F12. Ambos medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino 10% (v/v) y antibióticos: penicilina 100 µg/ml – estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen).

Cuando las células llegaron a una confluencia de 80-90% se tripsinizaron para ser repicadas o congeladas. Para repicar, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y posteriormente se trataron con 1 ml de tripsina 0,2% (p/v) 2 min a 37°C. Una vez desprendidas las células, se agregó 1 ml de medio suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Posteriormente las células se dividieron de acuerdo al número de placas que se necesitaba o se congelaron gradualmente a – 80°C en dimetilsulfoxido (DMSO).

Preparación de líneas celulares estables usando transfección e infección lentiviral

Realizado en el laboratorio del Dr. Eric Bennett de la Universidad de California en San Diego-USA (UCSD).

¡! NOTA: Todas las tareas se deben realizar en una cabina de Bioseguridad Tipo 2, en una instalación apropiada, usando guardapolvo, guantes y gafas en todo momento. Todos los residuos se deben desechar en un recipiente conteniendo lavandina 10%. Los residuos sólidos se deben recoger en una bolsa de riesgo biológico dentro de la campana y cerrarla antes de colocarla en la bolsa de riesgo biológico principal. Dos días después de la infección

con el virus, ya no son necesarios estos cuidados y se pueden reanudar los procedimientos habituales.

Día 0: Plaqueo de las células.

Las células HEK-293T se cultivaron en 2-2,5 ml de medio de cultivo por pocillo, en una placa de 6 pocillos. Se colocó la cantidad de células necesarias para obtener una confluencia de 50-60% cuando se transfectan al día siguiente. Algunos reactivos de transfección requieren el uso de un medio libre de antibióticos, pero esto no es necesario, con Mirus TransIT-293T.

Día 1: Transfección en placa de 6 pocillos.

Se colocó en un tubo la mezcla de transfección: 200 μ l de Opti-MEM (Invitrogen) y 9 μ l del reactivo Mirus TransIT-293 y se dejó a TA 5 min, se agitó suavemente. En otro tubo se agregó la mezcla de los cuatro “*helper plasmids*”: fago RC CMV, fago Hdm VSVG, fago Hdm Tat1b y fago Hdm GAG-POL (0,5 μ l de cada uno, concentración: 1 μ g/ μ l). Posteriormente se agregó 1 μ g del plásmido de interés (StarD7-pDEST). Ambos tubos se mezclaron y se incubó por 20 min. Toda la mezcla se añadió a un pocillo que contenía 1 ml de medio fresco.

El día previo a la infección se colocaron las células blanco: HEK-293T o HeLa, (que van a ser infectadas) en una placa de 6 pocillos, para tener 50-60% de confluencia en el día de la infección.

Día 2: Cosecha del virus (se puede almacenar a 4°C durante algunos días) e infección.

El virus se recogió después de 24 h (o puede ser 48 h) de la transfección. Se sacó el sobrenadante y se lo filtró a través de un filtro estéril de 0,45 μ m, en un tubo de 15 ml que contenía polibreno a una concentración final de 8 μ g/ml (Stock: 6 mg/ml en PBS). Este medio viral se agregó a las células blanco plaqueadas el día anterior, completando con 1 ml de medio fresco.

Día 3: Cambio de medio.

Veinticuatro horas después de la infección, se reemplazó el medio sin la selección de antibióticos y se dejó un día más para que las células se recuperen.

Día 4: Pasaje a una placa de 10 cm

Las células contenidas en la placa de 6 pocillos se tripsinizaron y se pasaron a una placa de 10 cm, para que continúen creciendo hasta una confluencia de aproximadamente 80%. Una vez alcanzada esta confluencia, se comienza la selección con puromicina 1 µg/ml (diluir el stock de 10 mg/ml, 1:10.000), renovando el medio todos los días. Como control de selección se agregó una placa con células que no fueron infectadas, las cuales deben morir. Las células que incorporaron el plásmido de interés crecieron normalmente, se pudieron repicar, congelar y / o recoger para los diferentes ensayos.

Transfección transiente con plásmidos de expresión

Se transfectaron células HepG2 con plásmidos que expresan las proteínas recombinantes: StarD7c-myc y StarD7GFP (creadas en el laboratorio), junto con sus vectores vacíos pCDNA/TO/c-myc y pGFPC1, según el protocolo del reactivo Lipofectamina 3000 (Invitrogen).

La mezcla de transfección conteniendo los siguientes reactivos: 4 µl de Lipofectamina 3000, 2,5 µg de ADN plasmídico y 5 µl del reactivo P3000 (Invitrogen) en 125 µl de Opti-MEM se incubó durante 20 minutos. Posteriormente se completó a 1 ml con Opti-MEM suplementado con suero 10% y antibióticos, y se agregó a las células previamente plaqueadas (60% de confluencia) o en suspensión (5×10^5 células). Después de 24 h, el medio es cambiado por DMEM suplementado.

Silenciamiento de StarD7 endógena

El ARN de interferencia (RNAi) es un fenómeno de silenciamiento de genes altamente específico y natural que se encuentra presente en varios organismos. Este puede ser desencadenado por diversas fuentes de moléculas de ARN, incluyendo virus de ARN, transposones, ARN pequeños endógenos doble cadena no codificante (miRNAs) o ARN exógenamente introducidos conocidos como siRNAs.

Las moléculas de ARN largas de doble cadena (dsRNA) dan origen al RNAi al ser cortadas por la actividad RNasa tipo III de la enzima Dicer en 21-23 nucleótidos (siRNAs) (Fig. 40). La cadena antisentido del siRNA llamada hebra guía, ya que sirve como guía determinando la secuencia específica de silenciamiento génico, mientras que la cadena

sentido se conoce como hebra pasajera. La hebra guía del siRNA se incorpora en un complejo ARN-proteína de múltiples componentes, denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) el cual silencia la expresión génica mediante la escisión del ARNm diana. Cuando existe perfecta complementariedad entre la secuencia de la cadena guía y la cadena diana, cerca del sitio de escisión, el ARNm diana se degrada. A diferencia de los siRNAs, los miRNAs por lo general no escinden el ARNm de un gen diana, pero suprimen la traducción del ARNm (Rana, 2007).

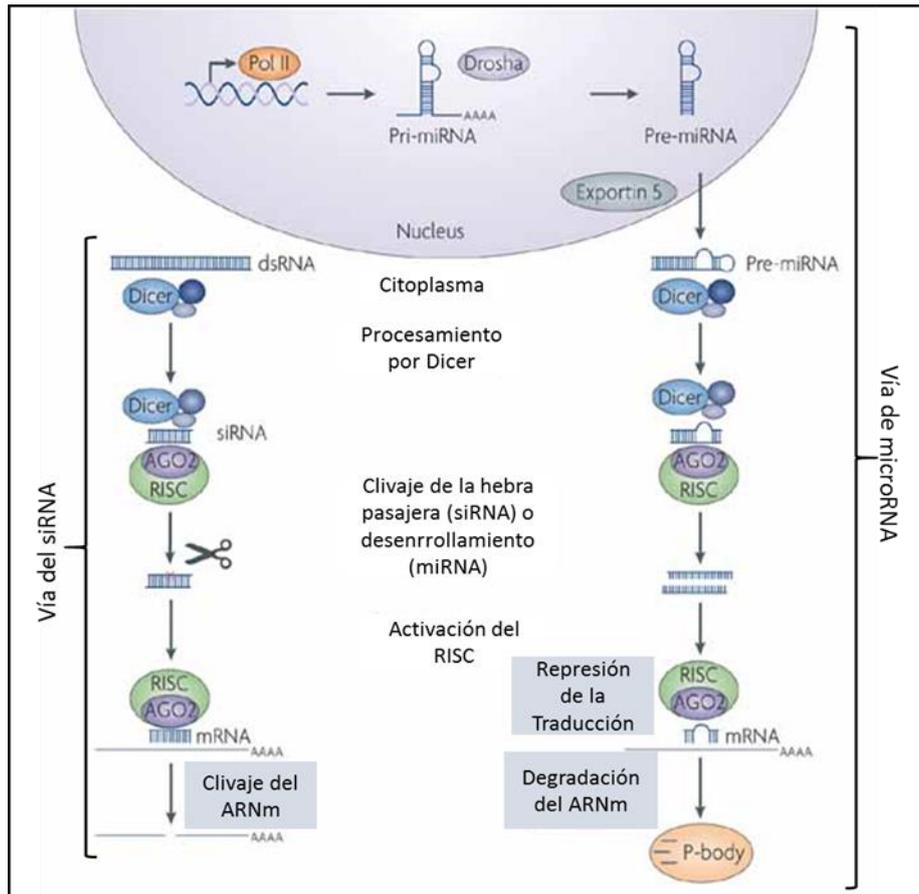


Figura 40. La vía de silenciamiento inducida por siRNAs comienza con la escisión de ARN largo de doble cadena (dsRNA) por el complejo de la enzima Dicer. Estos siRNAs se incorporan a la proteína Argonata 2 (AGO2) formando el complejo de silenciamiento AGO2-RISC. La hebra guía siRNA reconoce sitios diana para dirigir la degradación del ARNm (llevada a cabo por el dominio catalítico de AGO2). La vía de silenciamiento inducida por microRNAs comienza con la síntesis de los transcritos endógenamente codificados de microRNAs primarios (pri-miRNAs) por la ARN polimerasa II (Pol II) los que son procesados por el complejo enzimático Drosha para producir miRNAs precursores (pre-miRNAs). Estos precursores se exportan al citoplasma por Exportin 5 y posteriormente se unen al complejo formado por la enzima Dicer, que procesa el pre-miRNA en el complejo AGO2-RISC. El miRNA maduro reconoce sitios diana (típicamente en el 3'-UTR) en el ARNm, conduciéndolo a su degradación. Alternativamente la traducción de los ARNm puede ser inhibida por retención de éstos en organelas conocidas como "P-bodies". Extraído de Fougerolles et al., 2007.

En el presente trabajo de tesis se utilizó siRNA (*small interfering RNA*) como una herramienta para silenciar post-transcripcionalmente la expresión del gen StarD7. Para tal fin se obtuvieron dos diferentes siRNAs dirigidos contra la secuencia del transcripto de StarD7 (siD7.1 y siD7.2) como se muestra en la Figura 41. Los oligonucleótidos tienen la siguiente secuencia: siRNA1 sentido, 5'GGU AUA GUG UGG AUC AGG ATT3' correspondiente a la posición 1026-1046 y siRNA2 sentido, 5'GCA CCC ACC UUU ACC AGU ATT3' correspondiente a la posición 803-824 (Genbank AF270647) (Fig. 36). Se utilizó como control negativo siRNA *scrambled* (SilencerNegative™) (AppliedBiosystems/Ambion).

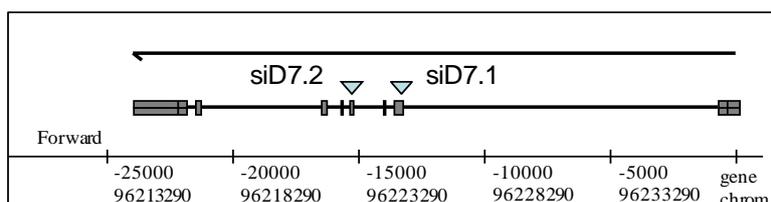


Figura 41. siRNAs (*small interfering RNA*) dirigidos contra la secuencia del transcripto de StarD7 (siD7.1 y siD7.2). Se representa linealmente el ARNm de StarD7, indicando con flechas los sitios en donde hibridan los oligonucleótidos sintetizados.

Procedimiento experimental:

Transfección con Lipofectamina 2000: El día previo a la transfección, las células se recogieron mediante tripsinización, se contaron en cámara de Neubauer y se colocaron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos, en medio suplementado. Después de 24 h, las células que consiguieron una confluencia de 30-40% se transfectaron con 50 a 200 nM de siD7.1 o siD7.2 para silenciar la expresión endógena de StarD7, o como control negativo siRNA *scrambled*, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se incubaron por separado durante 5 minutos, los siguientes volúmenes indicados por pocillo:

- ✓ 5 μ l de Lipo2000 en 250 μ l de Opti-MEM.
- ✓ 5 μ l de siD7 (provenientes de una dilución 20 pmol/ μ l) para obtener una concentración final de 100 nM ó 2 μ l de siRNA *scrambled* (proveniente de una dilución 50 μ M) en 250 μ l de Opti-MEM.

Luego se mezclaron e incubaron nuevamente durante 20 minutos a TA. Finalizado este tiempo, se añadió la mezcla a las células, previo lavado con PBS 1X, y se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO₂ (5% v/v). A las 6 h postransfección se añadió 2 ml de medio suplementado y se cultivaron durante 24, 48 ó 72 h, renovando el medio cada 24 h.

Transfección con RNAiMax: La transfección se realizó en solución, según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Brevemente, la mezcla de transfección conteniendo los siguientes reactivos: 4 μ l de RNAiMax y 50 nM de siD7 o siC en 125 μ l de Opti-MEM se incubó durante 20 minutos. Por otro lado, las células previamente recogidas con tripsina, se centrifugaron, se resuspendieron en Opti-MEM suplementado y se contaron en la cámara de Neubauer. Las células (3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos) se resuspendieron en un volumen final de 750 μ l de Opti-MEM suplementado, se mezclaron con los reactivos de transfección, se plaquearon y se cultivaron durante 24, 48 ó 72 h, renovando el medio cada 24 h.

Viabilidad celular/Citotoxicidad

La viabilidad celular se evaluó usando el colorante metabólico MTT (bromuro de 5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). El reactivo MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales se reduce a azul de formazán en las células vivas. Las células previamente transfectadas con siD7 o siC se sembraron en placas de 96 pocillos, colocando 1×10^4 células/pocillo y los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Luego de 48 h de silenciamiento, las células se trataron con concentraciones crecientes de mitoxantrona, droga anti-neoplásica, sustrato del transportador ABCG2, o con H_2O_2 durante 24 h. Posteriormente, se añadió una solución de MTT (5 mg/ml) al medio de cultivo (1:10) y las células se incubaron durante 2,5 h a 37°C. Finalizado este tiempo, se retiró el medio y el colorante precipitado se disolvió en 100 μ l de DMSO. La absorbancia se leyó a 540 nm, y los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad respecto al control.

Ensayo de acumulación/eflujo de mitoxantrona

Las células transfectadas con siD7 o siC se crecieron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (por cuadruplicado). Después de 72 h el medio se cambió por DMEM libre de rojo de fenol conteniendo MTX. En la fase de acumulación las células se incubaron 1 h a 37°C con 5 ó 20 mM de MTX. La captación se detuvo eliminando el medio y lavando las células con PBS 1X (3 veces) y luego se incubaron por 3 h sin MTX. En la fase de eflujo, las células se incubaron con 1 ó 5 μ M de MTX por 1 h, lavando las células con PBS 1X (3 veces) luego se

incubaron por 5 h sin MTX. La señal de fluorescencia intracelular se midió en el equipo lector Odyssey Clx y los datos se analizaron con el programa *Image Studio*. Para el ensayo de acumulación de mitoxantrona, se midió la señal de fluorescencia intracelular después de 3 h de lavado; mientras que para el ensayo de eflujo de mitoxantrona se midió la señal de fluorescencia en diferentes momentos del lavado. Adicionalmente se utilizó un citómetro de flujo FACSCanto II equipado con un láser de diodo rojo 635 nm y 670 nm de paso de banda láser para detectar la fluorescencia de MTX.

Detección de especies reactivas del oxígeno

La producción de ROS intracelular se detectó utilizando la sonda fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H2DCFDA). Las células silenciadas durante 48 h, se cultivaron en cubreobjetos durante 24 h en presencia o no de H₂O₂. Luego, las células se incubaron con 10 μM de H2DCFDA durante 30 min a 37°C, en medio DMEM libre de rojo de fenol. Finalizado ese tiempo, se lavaron 3 veces, con PBS 1X y los vidrios se visualizaron bajo microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000U (Nikon Corporation, Japón).

Migración celular

Ensayo de reparación de la herida (wound healing)

La migración celular se midió determinando la capacidad de las células de moverse hacia un espacio acelular. Para tal fin, se utilizaron monocapas confluentes de células transfectadas con siD7 o siC y cultivadas durante 72 h. Transcurrido ese tiempo se realizó sobre la monocapa una herida con un tip estéril de punta fina, la monocapa se lavó con PBS 1X para sacar las células que se desprendieron y se colocó medio suplementado. Se realizaron ensayos por duplicado y 3 heridas por pocillo. Se obtuvieron imágenes mediante microscopio invertido con contraste de fase (100X, Nikon Eclipse TE 2000U) a las 0, 8 y 24 h. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la distancia de la herida remanente respecto a la distancia inicial.

Ensayo en transwell

Alternativamente, se llevaron a cabo ensayos de migración utilizando un sistema bicameral de transwell (Cole Parmer), el cual contenía inserto filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μm . Células transfectadas durante 48 h con siD7 o siC, se tripsinizaron, se contaron colocando en la parte superior del transwell 2×10^4 células resuspendidas en 250 μl de medio suplementado. A su vez, en la parte inferior de la placa se colocó 500 μl de medio suplementado y se cultivaron 48 h a 37°C en atmósfera de CO_2 (5% v/v). Finalizado ese tiempo, las células que no migraron se removieron suavemente del compartimiento superior con un hisopo de algodón. Las células que migraron atravesando el filtro hacia la parte inferior del mismo se fijaron con metanol frío (20 minutos) y se tiñeron con Hoechst 33258 (tinción nuclear).

La tinción de los núcleos se observó en microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000U), tomando fotos de 7 campos al azar a 200X de ensayos duplicados. El resultado de tres experimentos se informó como porcentaje de migración relativa respecto al control.

Proliferación celular

Ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina

Se evaluó la proliferación celular mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) al ADN de células en división (en la fase S). Células silenciadas con siD7 o siC y cultivadas sobre cubreobjetos durante 72 h se expusieron a BrdU (20 μM Sigma) por 8 h. Finalizado ese tiempo, se lavaron tres veces con PBS 1X, se fijaron 10 min en 3% de paraformaldehído, y se lavaron tres veces con PBS 1X. Las células se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X-100 0,1% en PBS, se lavaron con PBS conteniendo Tween-20 0,2% (PBS-T), se trataron con HCl 2 N a 37°C durante 30 min para desnaturalizar el ADN, se lavaron dos veces (5 minutos/vez) con NaB_4O_7 0,1 M (pH 8,5) para neutralizar, y luego tres veces con PBS-T. Posteriormente se trataron con PBS-T conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) 2% y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (SIGMA) a una dilución 1:100 en PBS-T con BSA 1%, durante 1 h a 37°C. Luego, las células se lavaron tres veces (5 minutos/vez) con PBS-T y se incubaron 1 h a 37°C con anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 diluido 1:1000 en PBS-T con BSA 1%, posteriormente se tiñeron con Hoechst 33258 (tinción nuclear). Las células se lavaron tres veces (5 minutos/vez) con PBS-T

y los cubreobjetos se montaron en porta objetos en medio acuoso de montar (FluorSave, Calbiochem). Finalmente se tomaron 7 fotos al azar a 200X, por condición, en el microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000U) y se cuantificó el porcentaje de núcleos en proliferación (en rojo) respecto al número de núcleos totales (en azul).

Ensayo de incorporación de ³H-timidina

Se evaluó la incorporación de [5'-³H]-timidina en células transfectadas por 72 h con siD7 o siC. Finalizado ese tiempo, las células se tripsinizaron, se contaron y se sembraron por quintuplicado ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos cultivándolas durante 72 h. Transcurrido ese tiempo se adicionó [5'-³H] timidina (20 μ Ci/ml, actividad específica: 20 Ci/mmol) y las células se cultivaron por 18 h. Luego, las células se lavaron con PBS 1X, se agregó 100 μ l de tripsina para resuspenderlas y se las recogió en un cosechador semiautomático sobre papel de fibra de vidrio (Whatman 934-4H, WhatmanPaper LTD). El papel se dejó secar toda la noche y la radioactividad de las muestras se midió en un contador de centelleo líquido Beckman.

Adhesión celular

Los ensayos de adhesión se realizaron como se describe (Tauber et al., 2010), con modificaciones menores. Cubreobjetos se recubrieron con laminina (10 mg/ml, Sigma) durante toda la noche a 4°C, en PBS 1X, se lavaron dos veces con PBS, y se bloquearon durante 1 h con BSA 1 % (Sigma) en PBS .

Células HTR8/SVneo transfectadas con siD7 o siC y cultivadas durante 72 h, se tripsinizaron y se colocaron en placas de 24 pocillos conteniendo los cubreobjetos, 2×10^4 células por pocillo, en medio suplementado. Después de 30 min de incubación a 37°C se descartó el medio y las placas se lavaron con PBS para eliminar las células no adherentes, mientras que las adheridas se fijaron con metanol frío durante 10 min. Las células adheridas a los cubreobjetos se tiñeron con Hoechst 33258 y se cuantificaron observando diez campos al azar a 100X en microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000U).

Tratamiento con brefeldina A

BFA es un metabolito fúngico utilizado para interferir de forma reversible con el transporte anterógrado desde el RE al aparato de Golgi. Si bien tiene una amplia gama de actividad antibiótica, es utilizado principalmente como una herramienta de investigación biológica para el estudio del transporte de proteínas. El principal blanco de BFA es el factor de ADP-ribosilación, que es responsable de la asociación de las proteínas de cubierta COPI a la membrana del Golgi. El tratamiento conduce a una rápida acumulación de las proteínas dentro del RE y el colapso del aparato de Golgi, inhibiendo la secreción de proteínas.

El ensayo se realizó en células transfectadas con siD7 o siC y cultivadas sobre cubreobjetos en placa de 6 pocillos (5 vidrios/pocillo) durante 72 h. Antes del agregado de BFA se recogió un vidrio de cada pocillo como control (condición: sin BFA). Luego se incubó con BFA (concentración final: 5 µg/ml) 1 h a 37°C. Finalizado ese tiempo, se recogió otro cubreobjeto de cada pocillo (condición: BFA 1h). Las células se lavaron con PBS 1X y se agregó medio suplementado, recogiendo los 3 cubreobjetos restantes de cada pocillo a los 30 min, 1 h 30 min y 2 h 30 min del lavado. Los cubreobjetos conteniendo las células fueron fijados e incubados con el anticuerpo anti-giantina o GM-130 según el protocolo del ensayo de inmunofluorescencia.

Microscopía electrónica

Células HepG2 y JEG-3 sin tratar y transfectadas con siD7 o siC (como control de tratamiento) y cultivadas durante 72 h, fueron lavadas con PBS 1X, tripsinizadas y colocadas en un tubo eppendorf, manteniendo siempre en frío. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X, se centrifugaron a 1000 rpm 5 min y el pellet de cada condición se sumergió en la solución de fijado.

Para la obtención de fotos se contrató el servicio que brinda el Centro de Microscopía de la Facultad de Ciencias Médicas, donde funciona un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906-E. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con la ayuda de la Dra. Ana De Paul especialista en el tema.

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido: *western blot*

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10 %, durante 60 min a 150 V. La alícuota a sembrar de los extractos proteicos suspendidos en buffer de Laemmli, fue previamente hervida y centrifugada. Una vez terminada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience) mediante transferencia húmeda durante 60 min a 100 V, usando como buffer de transferencia (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% p/v, metanol 20% v/v, pH 9,2). Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo Ponceau y se enjuagó con abundante agua destilada. El perfil proteico obtenido se registró mediante un sistema de fotocopiado, lo que permite analizar la calidad y cantidad de las proteínas separadas en cada carril (no dejar nunca que la membrana se seque). Finalmente, la membrana se decoloró mediante lavados con TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,8), y se bloqueó con leche descremada 5% diluída en TBS que contenía Tween-20 0,2% (TBS-T), toda la noche a 4°C ó 1 h a TA con agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 h a TA, o toda la noche a 4°C con agitación suave. Se emplearon los anticuerpos primarios diluídos en TBS o en leche 5% - TBS-T, según la Tabla V del Anexo. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 2 veces a TA durante 5 min con TBS-T, y una vez 5 min con TBS. Finalmente, la membrana se incubó con la solución del anticuerpo dependiendo el sistema de detección a realizar:

-Detección por quimioluminiscencia: Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, dilución 1/5000 en TBS, anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón (Amersham Biosciences) durante 1 h a TA con agitación suave. Luego de lavar la membrana de nitrocelulosa se la incubó durante 2 min con el reactivo de electroquimiluminiscencia (SuperSignal West Pico; Pierce) y se expuso a placa radiográfica durante 1-10 min. La señal revelada se cuantificó utilizando un software de análisis de imágenes (GelPro Analyser).

- Detección por fluorescencia: Anticuerpo secundario conjugado (IRDye LI-COR) dilución 1/15000 en TBS, anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón durante 1 h a TA con agitación suave. Lavar 2 veces durante 5 min con TBS-T, y 2 veces 5 min con TBS. La señal se observó y analizó en el equipo lector Odyssey Clx a través del programa *Image Studio*.

Inmunofluorescencia de células

Antes de iniciar los cultivos, se colocaron en las placas cubreobjetos estériles. Finalizado el tiempo de cultivo, los cubreobjetos con las células adheridas, se lavaron con PBS 1X 3 veces y se fijaron, dependiendo del anticuerpo a utilizar, en paraformaldehído 3% a TA durante 10 min o en metanol frío 20 min. Luego, se lavaron con PBS 1X (3 veces) y se incubaron con $\text{Cl}(\text{NH}_4)$ 10 mM durante 10 min (para inhibir la pérdida de la fluorescencia). Se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 (0,01% v/v en PBS) durante 7 min y se lavó con PBS-T (3 veces). Posteriormente, los cubreobjetos se incubaron con suero de cabra 2,5% v/v (Sigma-Aldrich) en PBS-T, y luego con gelatina de piel de pescado 0,4% p/v en PBS-T, durante 15 min a TA en cada incubación. Los anticuerpos primarios se centrifugaron 10 min a 12.000 rpm y se diluyeron en gelatina de piel de pescado 0,4% p/v. Se utilizó una dilución 1/50 del anticuerpo policlonal de conejo anti-StarD7ct (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); una dilución 1/200 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-desmoplaquina (SIGMA); dilución 1/40 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ABCG2; dilución 1/100 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-GM130; dilución 1/800 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Giantina. Se incubaron durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron 5 veces con PBS-T (5min/vez) y los vidrios se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón (rojo, Alexa Fluor 594, Molecular Probes) o anti IgG de conejo (verde, Alexa Fluor 488, Molecular Probes) en suero de cabra 2,5% en PBS-T con una dilución final de los anticuerpos en 1/360, durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron 5 veces, (5 min/vez) con PBS-T y se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (tinción nuclear) durante 15 min a TA y se lavaron 5 veces con PBS-T (5 min/vez). Finalmente, los vidrios se sumergieron en agua destilada, se secaron bien escurriéndoles el exceso de líquido y se colocaron invertidos sobre un portaobjetos en medio acuoso de montar (FluorSave, Calbiochem). El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia se realizó en el microscopio invertido a 40X (NIKON Eclipse TE 2000U) o microscopio confocal Olympus FLUOVIEWFV300 (Olympus LatinAmerica, Miami, FL).

Análisis de fusión celular

Células JEG-3 y BeWo silenciadas con siD7 o siC y cultivadas sobre cubreobjetos durante 72 h, se lavaron con PBS 1X y se siguió el protocolo de inmunofluorescencia utilizando anti-desmoplaquina como marcador de las uniones desmosomales (rojo) y los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Se contó el número de núcleos en sincicios y el número total de núcleos en veinte campos elegidos aleatoriamente. El porcentaje de los núcleos en los sincicios se determinó como: (número de núcleos en los sincicios/número total de núcleos) x 100. Cada experimento se realizó al menos tres veces de forma independiente por duplicado.

Medición de la secreción de β hCG

La cantidad de β hCG secretada al medio de cultivo se cuantificó mediante un ensayo inmunométricoquimioluminiscente con un límite de detección de 1,0 mUI/ml (Siemens IMMULITE 2000). Los ensayos se realizaron utilizando los medios de cultivo de células JEG-3 tratadas con siD7 o siC y cultivadas durante 48 ó 72 h.

Inmunoprecipitación y preparado de las muestras para espectrometría de masas

Realizado en el laboratorio del Dr. Eric Bennett de la Universidad de California en San Diego-USA (UCSD) (Bennett et al., 2007).

Inmunoprecipitación

Células HEK-293T establemente transfectadas con plásmidos que expresan StarD7 I/II-HA, se cultivaron en 4 placas de 15 cm para cada condición, se lavaron con PBS 1X, se desprendieron de la placa con 4 ml de tripsina-EDTA (incubando 5 min a TA) y se recogieron en un tubo de 50 ml, conteniendo 20 ml de DMEM frío suplementado. Las células se centrifugaron 3 min a 2500 rpm, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron nuevamente, recogiendo el pellet en 3 ml del buffer no desnaturizante MCLB (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, NaCl 150 mM, NP40 0,5%, más el agregado de inhibidores de proteasas, Roche). Los lisados celulares, mantenidos en hielo, se dividieron en tubos eppendorf de 1,5 ml, se sonicaron durante 20 seg y se centrifugaron 10 min a 13000 rpm a 4°C. Luego, se filtraron en una

columna con filtro 0,45mm (Millipore # UFC4 0HV 00) mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 4°C.

Se utilizaron 60 µl de la suspensión de perlas de agarosa covalentemente unidas al anticuerpo anti-HA monoclonal (SIGMA) para cada condición. Las perlas se lavaron 4 veces con 1 ml del buffer MCLB frío cada vez, centrifugando 1 min a 3000 rpm a 4°C, se resuspendieron en el mismo buffer y se agregaron a los lisados celulares contenidos en tubos eppendorf. Se incubaron toda la noche a 4°C, con agitación rotacional continua. Una vez que se completó la unión de la proteína StarD7-HA a las perlas de agarosa, los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes se removieron (guardar como control del lisado no unido) dejando siempre un volumen de 100 µl (sólo para asegurarse de que no se retiran ninguna de las perlas). Luego los volúmenes se juntaron en un solo tubo y se realizaron 4 lavados con 1 ml del buffer MCLB frío cada vez, centrifugando 1 min a 3000 rpm a 4°C. Posteriormente, se realizó el cambio de buffer para eliminar el detergente, lavando como se indicó anteriormente, con PBS 1X frío.

La elución de la proteína unida al anticuerpo anti-HA se realizó con 50 µl del péptido HA en PBS 1X (250 mg/ml) 3 veces, incubando 30 min/vez a TA, obteniendo un volumen final de 150 µl. Se recomienda el uso de tips punta fina (P3111) para extraer todo el líquido sin levantar ninguna perla. El ensayo puede ser controlado mediante un ensayo de *western blot* utilizando el 10% de la elución.

Precipitación con TCA

Las muestras proteicas que se analizaron por espectrometría de masa se precipitaron con TCA y se digirieron con tripsina. Para esto, a cada tubo eppendorf conteniendo las proteínas disueltas en PBS 1X, se les agregó un volumen de TCA al 100% (concentración final 20%) se agitó, se colocó en hielo durante 30 min y luego se centrifugó 30 min a 4°C a máxima revolución. Se descartó el sobrenadante, dejando unos 50 µl de la solución en el tubo (ya que no se ve ningún pellet). Se lavó con 500 µl de TCA 10% frío y se centrifugó 15 min a 4°C a máxima revolución, posteriormente se lavó 3 veces con 1 ml de acetona (almacenada a -20°C), y nuevamente se centrifugó 10 min a 4°C a máxima velocidad. En el lavado final de acetona se dejó 20 µl de solución en el tubo. Por último, la muestra se centrifugó en un Speedvac (o se puede secar al aire a TA), quedando solo el pellet que puede

no ser visualizado y que puede almacenarse a -20°C (corto plazo) o -80°C (a largo plazo) si se desea.

Digestión con tripsina y paso a través de una membrana C18

Se preparó una solución de tripsina a una concentración de $25\text{ ng}/\mu\text{l}$ en 50 mM de bicarbonato de amonio pH 8.0 /10% de acetonitrilo (la tripsina se encuentra a $500\text{ ng}/\mu\text{l}$), por lo que para cada reacción de digestión se utilizó $1\ \mu\text{l}$ de tripsina en $20\ \mu\text{l}$ de bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.0/10% de acetonitrilo. (Si la mezcla de digestión es ácida la tripsina no funcionará). Se incubó la muestra durante 4 h o toda la noche a 37°C . Después de la digestión se añadió $20\ \mu\text{l}$ de ácido fórmico 5%/acetonitrilo al 5% y se incubó a TA durante 10 min. Esto inactiva la tripsina y acidifica la solución para asegurar la purificación adecuada de los péptidos en los pasos posteriores. La muestra se secó en un evaporador centrífugo (speedvac). El pellet se resuspendió en $20\ \mu\text{l}$ de ácido fórmico 5%/acetonitrilo al 5%.

Por otro lado, se prepararon minifiltros, mediante la colocación de 3 membranas C18 (Empore™ SPE Extraction Disks) incrustadas en la punta de tips de punta ancha (P1000) contenidos en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se añadió $40\ \mu\text{l}$ de metanol 100% y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 segundos (antes de centrifugar en cada paso se debe asegurar que no haya burbujas de aire entre el líquido y la resina en la punta del tip). No todo el metanol pasó a través del tip, se dejó en metanol 5 min, luego se centrifugó el resto a 3000 rpm durante 1 min (no debe haber volumen de líquido por encima de la resina). El metanol del tubo que pasó a través de la membrana se descartó. Después, se añadió $20\ \mu\text{l}$ de ácido fórmico 50%/acetonitrilo al 5% y se centrifugó procediendo de igual forma. Posteriormente, se añadió $20\ \mu\text{l}$ de ácido fórmico 5%/acetonitrilo al 5% y se centrifugó (2 veces).

Se agregó cada muestra conteniendo los péptidos digeridos ($20\ \mu\text{l}$) a la punta de tips conteniendo las membranas y se centrifugó durante 2 minutos a 1500 rpm. Se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 2000 rpm (comprobando si hay líquido por encima de la punta del tip). Si se requiere otra centrifugación, hacerlo a 1 min a 2500 rpm y se puede repetir durante 30 segundos a 3000 rpm (debe haber sólo un pequeño volumen de líquido por encima de la resina, y la resina no debe estar seca). Se recogió este sobrenadante y se guardó. Para lavar, se adicionó $30\ \mu\text{l}$ de ácido fórmico 5% y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min (debe pasar todo el líquido).

Para eluir, se añadió al tip 30 μ l de ácido fórmico 75%/acetonitrilo al 5% (en un tubo nuevo) y se centrifugó durante 2 minutos a 1500 rpm. Se centrifugó de nuevo durante 2 minutos a 2000 rpm. Igualmente si otro centrifugado fuera necesario, hacerlo a 2500 rpm a 1 min y se puede repetir durante 30 segundos a 3000 rpm. En esta etapa, se debe pasar todo el líquido a través de la punta del tip de manera que la resina se seque (se recomienda guardar el tip con la membrana hasta que las muestras se analicen en el espectrómetro de masas).

La muestra se secó en un evaporador centrífuga (Speedvac). Luego, se añadió 10 μ l de ácido fórmico 5%/acetonitrilo al 5% y se colocó el total del volumen en un vial de espectrometría de masas. Se puede congelar hasta el momento de ejecutar el ensayo.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Φ Los datos de cada experimento fueron agrupados en paramétricos y no paramétricos para su análisis y gráfico. En los experimentos que se obtenía un $n \geq 4$, se utilizó el test Kolmogorov-Smirnov para identificar la distribución que presentaban los datos, mientras que los datos de los ensayos por triplicado ($n=3$), fueron considerados por definición no paramétricos.

Φ Los datos no paramétricos fueron representados en los gráficos por la mediana y el rango intercuartil. Los datos que presentaron distribución Normal fueron graficados por su media \pm SEM.

Φ Las diferencias significativas para las condiciones del control y del ensayo fueron identificadas mediante la prueba t-test no paramétrica de Wilcoxon apareada o desapareada de Mann-Whitney U-test.

Φ Se realizó Kruskal-Wallis y pos-test Dunn para obtener una comparación múltiple de poblaciones de muestras independientes.

Φ Se realizó ANOVA de dos vías y pos-test Bonferroni en los gráficos de puntos (ensayos de viabilidad y la cinética del silenciamiento midiendo estrés de RE) para una comparación de muestras independientes.

Φ Se tomó como valor de significancia $p \leq 0,01$ ó $p \leq 0,05$, según los datos.

ANEXO

Tabla II. Genes diferencialmente expresados en células JEG-3 tratadas durante 48 h con 200 nM de siD7.1 o siC. Los genes se agruparon de acuerdo a su función celular resaltando los transcritos validados por RT-PCR en tiempo real.

Gen	Símbolo del Gen	Veces de Cambio	Valor <i>p</i>
StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7	STARD7	-2,5	9,10e ⁻¹⁰
PROCESOS CELULARES			
Gap junction protein, alpha 1, 43kDa/Connexin 43	GJA1/Cn43	-1,9	1,27 e ⁻⁰³
Thrombospondin, type I, domain containing 7A	THSD7A	-1,7	4,25 e ⁻⁰⁴
TRADUCCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN			
<i>Factores de transcripción y Reguladores de la Transcripción</i>			
Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	TCF3	1,5	4,72 e ⁻⁰⁴
Kruppel-like factor 11	KLF11	1,6	1,90 e ⁻⁰³
Far upstream element (FUSE) binding protein 1	FUBP1	1,6	8,32 e ⁻⁰⁴
Putative nucleic acid binding protein RY-1	RY1	1,6	1,14 e ⁻⁰³
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	DDX3Y	1,7	2,41 e ⁻⁰⁴
Zinc finger protein 204	ZNF204	1,7	2,18 e ⁻⁰⁴
Vestigial like 1 (Drosophila)	VGLL1	-1,5	2,47 e ⁻⁰²
Runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)	RUNX1	-1,5	2,36 e ⁻⁰²
Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)	TWIST1	-1,5	1,53 e ⁻⁰²
<i>Proteínas asociadas al ADN</i>			
DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)	DFFB	1,7	1,80 e ⁻⁰³
Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	POLR3E	1,7	6,16 e ⁻⁰⁴
Methyl-CpG binding domain protein 2	MBD2	-3,0	7,00 e ⁻⁰⁹
<i>Procesamiento y transporte del ARN</i>			
M-phase phosphoprotein 9	MPHOSPH9	1,5	4,27 e ⁻⁰⁴
G-rich RNA sequence binding factor 1	GRSF1	1,7	3,44 e ⁻⁰⁴
La ribonucleoprotein domain family, member 1	LARP1	-1,8	5,62 e ⁻⁰⁸
Splicing factor 1	SF1	-1,8	3,95 e ⁻⁰³
Nucleoporin like 1	NUPL1	-1,7	4,47 e ⁻⁰⁴
Formin homology 2 domain containing 3	FHOD3	-1,6	1,32 e ⁻⁰²

Gen	Símbolo del Gen	Veces de Cambio	Valor p
<i>Proteínas Ribosomales</i>			
Ribosomal protein L15 /// similar to ribosomal protein L15	LOC646672	-1,5	1,83 e ⁻⁰²
Ribosomal protein L31	RPL31	-1,5	1,02 e ⁻⁰³
ENZIMAS			
<i>Metabolismo de Carbohidratos</i>			
Glucosidase I	GCS1	1,5	4,14 e ⁻⁰⁴
Sorbitol dehydrogenase	SORD	1,5	1,80 e ⁻⁰³
<i>Metabolismo de Lípidos</i>			
Apolipoprotein M	APOM	-1,6	2,67 e ⁻⁰²
Abhydrolase domain containing 6	ABHD6	-1,5	1,10 e ⁻⁰³
<i>Metabolismo de aminoácidos</i>			
Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	INDO	-1,6	3,03 e ⁻⁰²
<i>Estrés oxidativo</i>			
Protein disulfide isomerase family A, member 2	PDIA2	1,5	1,09 e ⁻⁰³
Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	ALDH9A1	1,6	2,52 e ⁻⁰⁴
Carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	CES1	-1,6	4,47 e ⁻⁰²
Aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	AKR1C3	-1,6	6,86 e ⁻⁰⁴
Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-Steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)	SRD5A1	-1,5	2,93 e ⁻⁰³
P450 (cytochrome) oxidoreductase	POR	-1,5	1,05 e ⁻⁰²
<i>ATPasas y proteínas relacionadas</i>			
ATPase, Class V, type 10B	ATP10B	-1,7	4,87 e ⁻⁰³
<i>Otras enzimas</i>			
Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15	NUDT15	2,1	4,85 e ⁻⁰⁴
Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	HS2ST1	1,6	1,45 e ⁻⁰³
VÍAS DE SEÑALAMIENTO			
<i>Proteínas quinasas y factores relacionados</i>			
Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	CALM1	1,5	3,51 e ⁻⁰⁴
RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	RASGRP2	2,1	1,30 e ⁻⁰⁴
TYRO3 protein tyrosine kinase	TYRO3	-1,5	3,91 e ⁻⁰²
TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	-1,5	1,34 e ⁻⁰²

Gen	Símbolo del Gen	Veces de Cambio	Valor p
Misshapen-like kinase 1 (zebrafish)	MINK1	-1,5	3,00 e ⁻⁰²
Otras vías de señalamiento			
Trefoil factor 1	TFF1	1,5	1,35 e ⁻⁰³
Nicalin homolog (zebrafish)	NCLN	1,5	4,79 e ⁻⁰⁴
Ankyrin repeat domain 28	ANKRD28	1,6	7,87 e ⁻⁰⁵
Ankyrin repeat domain 46	ANKRD46	1,9	3,32 e ⁻⁰³
Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4	-1,6	1,78 e ⁻⁰²
Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	-1,6	1,47 e ⁻⁰²
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y DEL CITOESQUELETO			
Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	1,5	1,37 e ⁻⁰³
Nidogen 1	NID1	1,8	2,70 e ⁻⁰⁴
Osteomodulin	OMD	1,8	3,69 e ⁻⁰⁵
Glypican 4	GPC4	-1,5	1,09 e ⁻⁰²
TRÁFICO DE VESÍCULAS			
Microtubule-actin crosslinking factor 1	MACF1	1,5	1,10 e ⁻⁰³
KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1	KDEL1	1,5	2,06 e ⁻⁰³
Kinesin light chain 1	KLC1	1,5	3,87 e ⁻⁰⁴
Choroideremia-like (Rab escort protein 2)	CHML	-1,7	5,14 e ⁻⁰⁵
RAB GTPase activating protein 1-like	RABGAP1L	-1,5	2,50 e ⁻⁰²
RECEPTORES, TRANSPORTADORES Y CARRIERS			
Receptores de membrana			
Epithelial membrane protein 2	EMP2	1,5	7,20 e ⁻⁰⁵
Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	TGFBR2	-1,5	7,26 e ⁻⁰³
Transportadores y carriers			
Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	SLC16A3	1,5	2,0 e ⁻⁰⁴
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	SLC7A7	-1,6	9,11 e ⁻⁰⁵
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	KCNJ13	-1,5	2,22 e ⁻⁰²
Solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5)	SLC16A4	-1,5	1,59 e ⁻⁰³
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	ABCG2	-1,5	1,15 e ⁻⁰³
SAR1 gene homolog B (S. cerevisiae)	SAR1B	1,6	6,32 e ⁻⁰⁴

Gen	Símbolo del Gen	Veces de Cambio	Valor p
CATABOLISMO DE PROTEÍNAS			
<i>Enzimas que conjugan ubiquitina</i>			
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	PSMD12	1,6	1,56 e ⁻⁰³
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	SMURF2	1,7	6,60 e ⁻⁰²
Ubiquitin specific peptidase 52	USP52	-1,5	4,12 e ⁻⁰²
<i>Proteínas relacionadas al proteosoma</i>			
Chromosome 3 open reading frame 63	C3orf63	1,5	2,16 e ⁻⁰³
Chromosome 6 open reading frame 32	C6orf32	-1,5	3,45 e ⁻⁰⁴
<i>Proteasas</i>			
Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, Aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	ANPEP	1,5	2,07 e ⁻⁰³
Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	1,5	2,11 e ⁻⁰³
Membrane metallo-endopeptidase	MME	-1,8	1,69 e ⁻⁰³
Chymotrypsin-like	CTRL	-1,5	4,00 e ⁻⁰³
RESPUESTA IMMUNE, CITOQUINAS Y PROTEÍNAS RELACIONADAS			
Interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	ILF3	1,5	1,77 e ⁻⁰³
Caspase recruitment domain family, member 10	CARD10	1,5	9,76 e ⁻⁰⁴
Pre-B-cell colony enhancing factor 1	PBEF1	1,5	1,67 e ⁻⁰³
Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	1,6	7,02 e ⁻⁰⁴
Pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	1,8	1,79 e ⁻⁰²
Interferon, alpha-inducible protein 6	IFI6	-1,5	4,48 e ⁻⁰⁴
Complement component 4A (Rodgers blood group) /// Complement component 4B (Chido blood group)	C4A /// C4B	-1,5	2,07 e ⁻⁰²
OTROS			
HEG homolog 1 (zebrafish)	HEG1	1,5	3,96 e ⁻⁰⁴
WD repeat domain 43	WDR43	1,5	2,07 e ⁻⁰³
Transmembrane protein 5	TMEM5	1,5	3,13 e ⁻⁰⁴
Epithelial membrane protein 2	EMP2	1,5	7,20 e ⁻⁰⁵
LSM14A, SCD6 homolog A (S. cerevisiae)	LSM14A	1,6	1,24 e ⁻⁰³
Coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	F5	-1,5	4,18 e ⁻⁰²

Tabla IV. Se listan los *primers* utilizados en la amplificación por Real Time PCR, sus respectivas secuencias y la concentración final en el tubo de reacción.

Gen	Secuencia (5' - 3')	nM
<i>β</i>-hCG (<i>β</i>-subunit human chorionic gonadotropin)	Sense: GCTACTGCCCCACCATGACC Antisense: ATGGACTCGAAGCGCACATC	300
ABCG2 (<i>ATP-binding cassette, sub-family G member 2</i>)	Sense: CAATGGGATCATGAAACCTG Antisense: CATTTATCAGAACATCTCCAGA	250
Ciclofilina A	Sense: GTCAACCCCACCGTGTCTT Antisense: CTGCTGTCTTTGGGACCTGT	200
Cnx43 (<i>Connexin 43</i>)	Sense: ACTTGCCTTTTCATTTACTTC- Antisense: CCTGGGCACCACTCTTTT	250
HO-1 (<i>Hemo Oxigenasa-1</i>)	Sense: AGGCCAAGACTGCGTTCC Antisense: GCAGAATCTTGCACTTTGTTGCT	150
KDEL1 (<i>Lys-Asp-Glu-Leu containing 1</i>)	Sense: ATGGGCCGGGTAAGTCTGGA Antisense: CGAGTCTCTTTGCGGCTGT	200
MBD2 (<i>Methyl-CpG binding domain protein 2</i>)	Sense: AACCTGCTGTTTGGCTAAC Antisense: CGTACTTGCTGTACTIONGCTCTTC	200
NID1 (<i>Nidogen-1</i>)	Sense: CTGGAGGACGGGGATGACTTA Antisense: CGGGGGTTCACCTCGTAGCAA	250
Sincitina-1	Sense: GCAACCACGAACGGACATC Antisense: GTATCCAAGACTCCACTCCAGC	150
SMURF2 (<i>SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2</i>)	Sense: TAGCCCTGGCAGACCTCTT Antisense: CTTGTTGCGTTGTCCTCTGT	200
StarD7 (<i>StAR-related lipid transfer domain protein 7</i>)	Sense: GGTAATCAAGCTGGAGGTGATTG Antisense: GAGTACATTGGATAAGGAAAATGGGT	250
THSD7A (<i>Thrombospondin type I domain containing 7A</i>)	Sense: ATGATCAGCAAGGGAAAAAAG Antisense: TCATAACAGGCAGGCTCTTC	200
TGFβRII (<i>Transforming growth factor beta receptor II</i>)	Sense: GCTCCAATATCCTCGTGAAG Antisense: CACTGCATTACAGCGAGATG	200
TWIST1 (<i>Twist homolog 1</i>)	Sense: CCGGAGACCTAGATGTCAT Antisense: CTGTTTCTTTGAATTTGGATT	200

Tabla V. Características generales de los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de *western blot* y detalles experimentales.

Proteína/PM	Anticuerpo primario	Dilución	Incubación
β-hCG (<i>β-subunit human chorionic gonadotropin</i>), 27 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (Dako Denmark)	1/1000 en TBS	Toda la noche a 4°C
ABCG2 (<i>ATP-binding cassette, sub-familyG member2</i>), 72 kDa	Anticuerpo monoclonal de ratón (clon BXP-21, Santa Cruz)	1/300 en TBS	Toda la noche a 4°C
Actina, 42 kDa	Anticuerpo monoclonal de ratón (SIGMA)	1/3000 en TBS	1 h a TA
BiP/GRP78 (<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>), 78 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling)	1/1000 en albúmina 5% -TBST	Toda la noche a 4°C
Calnexina, 90kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling)	1/1000 en albúmina 5% - TBST	Toda la noche a 4°C
GFP (<i>green fluorescent protein</i>), 27 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (sc-8334, Santa Cruz)	1/1000 en TBS	Toda la noche a 4°C
HO-1 (<i>Hemo Oxigenasa-1</i>), 32 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (sc-10789, Santa Cruz)	1/200 en leche 5% - TBST	Toda la noche a 4°C
IRE1 (<i>inositol-requiring 1</i>), 130 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling)	1/1000 en albúmina 5% - TBST	Toda la noche a 4°C
PDI (<i>protein disulfide isomerase</i>) 57 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling)	1/1000 en albúmina 5%-TBST	Toda la noche a 4°C
PERK (<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>), 140 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling)	1/500 en albúmina 5%-TBST	Toda la noche a 4°C
StarD7 (<i>StAR-related lipid transfer domain protein 7</i>), 35 kDa	Anticuerpo policlonal de conejo (0,5 μ g/ml)	1/500 en TBS	1 h a TA
α-tubulina, 55 kDa	Anticuerpo monoclonal (clon DM1A) de ratón (SIGMA)	1/3000 en TBS	1 h a TA
c-myc, 67 kDa	Anticuerpo monoclonal (clon 9E10, Santa Cruz)	1/1000 en TBS	Toda la noche a 4°C

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, S. H., Chui, C., Schilbach, S. L., Yu, X. X., Goddard, A. D., Grimaldi, J. C., Lee, J., Dowd, P., Colman, S. and Lewin, D. A. (2001). BFIT, a unique acyl-CoA thioesterase induced in thermogenic brown adipose tissue: cloning, organization of the human gene and assessment of a potential link to obesity. *Biochem J* 360(Pt 1): 135-42.
- Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C. and Pijnenborg, R. (2006). Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 21(1): 193-201.
- Alpy, F., Legueux, F., Bianchetti, L. and Tomasetto, C. (2009). [START domain-containing proteins: a review of their role in lipid transport and exchange]. *Med Sci (Paris)* 25(2): 181-91.
- Alpy, F., Stoeckel, M. E., Dierich, A., Escola, J. M., Wendling, C., Chenard, M. P., Vanier, M. T., Gruenberg, J., Tomasetto, C. and Rio, M. C. (2001). The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem* 276(6): 4261-9.
- Alpy, F. and Tomasetto, C. (2005). Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J Cell Sci* 118(Pt 13): 2791-801.
- Alpy, F. and Tomasetto, C. (2014). START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie* 96: 85-95.
- Anderica-Romero, A. C., Gonzalez-Herrera, I. G., Santamaria, A. and Pedraza-Chaverri, J. (2013). Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies. *Redox Biol* 1(1): 366-72.
- Angeletti, S., Maggio, B. and Genti-Raimondi, S. (2004). Surface activity and interaction of StarD7 with phospholipid monolayers. *Biochem Biophys Res Commun* 314(1): 181-5.
- Angeletti, S., Rena, V., Nores, R., Fretes, R., Panzetta-Dutari, G. M. and Genti-Raimondi, S. (2008). Expression and localization of StarD7 in trophoblast cells. *Placenta* 29(5): 396-404.
- Angeletti, S., Sanchez, J. M., Chamley, L. W., Genti-Raimondi, S. and Perillo, M. A. (2011). StarD7 behaves as a fusogenic protein in model and cell membrane bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1818(4): 425-433.
- Arakane, F., King, S. R., Du, Y., Kallen, C. B., Walsh, L. P., Watari, H., Stocco, D. M. and Strauss, J. F., 3rd (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272(51): 32656-62.
- Atilla-Gokcumen, G. E., Muro, E., Relat-Goberna, J., Sasse, S., Bedigian, A., Coughlin, M. L., Garcia-Manyes, S. and Eggert, U. S. (2014). Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell* 156(3): 428-39.
- Bai, Q., Li, X., Ning, Y., Zhao, F. and Yin, L. (2010). Mitochondrial cholesterol transporter, StAR, inhibits human THP-1 monocyte-derived macrophage apoptosis. *Lipids* 45(1): 29-36.
- Bankaitis, V. A., Garcia-Mata, R. and Mousley, C. J. (2012). Golgi membrane dynamics and lipid metabolism. *Curr Biol* 22(10): R414-24.
- Barlow, C. A., Laishram, R. S. and Anderson, R. A. (2010). Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum. *Trends Cell Biol* 20(1): 25-35.
- Bennett, E. J., Shaler, T. A., Woodman, B., Ryu, K. Y., Zaitseva, T. S., Becker, C. H., Bates, G. P., Schulman, H. and Kopito, R. R. (2007). Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448(7154): 704-8.
- Bexiga, M. G. and Simpson, J. C. (2013). Human diseases associated with form and function of the Golgi complex. *Int J Mol Sci* 14(9): 18670-81.
- Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H. R. and Chae, H. J. (2012). An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int J Mol Sci* 14(1): 434-56.
- Blom, T., Somerharju, P. and Ikonen, E. (2011). Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8): a004713.
- Bose, H. S., Whittall, R. M., Ran, Y., Bose, M., Baker, B. Y. and Miller, W. L. (2008). StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein. *Biochemistry* 47(8): 2277-88.

- Braun, J. E., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2012). A molecular link between miRISCs and deadenylases provides new insight into the mechanism of gene silencing by microRNAs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(12).
- Burleigh, D. W., Kendzierski, C. M., Choi, Y. J., Grindle, K. M., Grendell, R. L., Magness, R. R. and Golos, T. G. (2007). Microarray analysis of BeWo and JEG3 trophoblast cell lines: identification of differentially expressed transcripts. *Placenta* 28(5-6): 383-9.
- Burton, G. J. and Yung, H. W. (2011). Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens* 1(1-2): 72-78.
- Bushati, N. and Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205.
- Camolotto, S., Racca, A., Rena, V., Nores, R., Patrio, L. C., Genti-Raimondi, S. and Panzetta-Dutari, G. M. (2010). Expression and transcriptional regulation of individual pregnancy-specific glycoprotein genes in differentiating trophoblast cells. *Placenta* 31(4): 312-9.
- Carvou, N., Holic, R., Li, M., Futter, C., Skippen, A. and Cockcroft, S. (2010). Phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-transfer activity of PITPbeta is essential for COPI-mediated retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 123(Pt 8): 1262-73.
- Clark, B. J. (2012). The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *J Endocrinol* 212(3): 257-75.
- Cohen, D. E., Green, R. M., Wu, M. K. and Beier, D. R. (1999). Cloning, tissue-specific expression, gene structure and chromosomal localization of human phosphatidylcholine transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 1447(2-3): 265-70.
- Chang, I. Y., Kim, J. K., Lee, S. M., Kim, J. N., Soh, J., Kim, J. W. and Yoon, S. P. (2009). The changed immunoreactivity of StarD6 after pilocarpine-induced epilepsy. *Neuroreport* 20(10): 963-7.
- Charman, M., Colbourne, T. R., Pietrangelo, A., Kreplak, L. and Ridgway, N. D. (2014). Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 (ORP4) is essential for cell proliferation and survival. *J Biol Chem* 289(22): 15705-17.
- Chen, D., Latham, J., Zhao, H., Bisoffi, M., Farelli, J. and Dunaway-Mariano, D. (2012). Human Brown Fat Inducible Thioesterase Variant 2 Cellular Localization and Catalytic Function. *Biochemistry* 51(35): 6990-6999.
- Chen, Y. C., Meier, R. K., Zheng, S., Khundmiri, S. J., Tseng, M. T., Lederer, E. D., Epstein, P. N. and Clark, B. J. (2009). Steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain protein 5 localization and regulation in renal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 297(2): F380-8.
- Chen, Z., Liu, F., Ren, Q., Zhao, Q., Ren, H., Lu, S., Zhang, L. and Han, Z. (2010). Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. *Int J Cancer* 126(4): 841-51.
- Dai, K., Liao, S., Zhang, J., Zhang, X. and Tu, X. (2011). Solution structure of tensin2 SH2 domain and its phosphotyrosine-independent interaction with DLC-1. *PLoS One* 6(7): e21965.
- Das, S. K., Chu, W. S., Mondal, A. K., Sharma, N. K., Kern, P. A., Rasouli, N. and Elbein, S. C. (2008). Effect of pioglitazone treatment on endoplasmic reticulum stress response in human adipose and in palmitate-induced stress in human liver and adipose cell lines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(2): E393-400.
- de Fougères, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J. and Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6(6): 443-53.
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastre, B., Bourguet, W., Antony, B. and Drin, G. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J Cell Biol* 195(6): 965-78.
- de Wilde, J., Mohren, R., van den Berg, S., Boekschoten, M., Dijk, K. W., de Groot, P., Muller, M., Mariman, E. and Smit, E. (2008). Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Physiol Genomics* 32(3): 360-9.
- Deng, R. P., He, X., Guo, S. J., Liu, W. F., Tao, Y. and Tao, S. C. (2014). Global identification of O-GlcNAc transferase (OGT) interactors by a human proteome microarray and the construction of an OGT interactome. *Proteomics* 14(9): 1020-30.

- Deuring, J. J., de Haar, C., Koelewijn, C. L., Kuipers, E. J., Peppelenbosch, M. P. and van der Woude, C. J. (2012). Absence of ABCG2-mediated mucosal detoxification in patients with active inflammatory bowel disease is due to impeded protein folding. *Biochem J* 441(1): 87-93.
- Dong, Y. F., Soung do, Y., Chang, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Paris, M., O'Keefe, R. J., Schwarz, E. M. and Drissi, H. (2007). Transforming growth factor-beta and Wnt signals regulate chondrocyte differentiation through Twist1 in a stage-specific manner. *Mol Endocrinol* 21(11): 2805-20.
- Durand, S., Angeletti, S. and Genti-Raimondi, S. (2004). GTT1/StarD7, a novel phosphatidylcholine transfer protein-like highly expressed in gestational trophoblastic tumour: cloning and characterization. *Placenta* 25(1): 37-44.
- Durkin, M. E., Yuan, B. Z., Zhou, X., Zimonjic, D. B., Lowy, D. R., Thorgeirsson, S. S. and Popescu, N. C. (2007). DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor. *J Cell Mol Med* 11(5): 1185-207.
- Ee, P. L., He, X., Ross, D. D. and Beck, W. T. (2004). Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. *Mol Cancer Ther* 3(12): 1577-83.
- Elwell, C. A., Jiang, S., Kim, J. H., Lee, A., Wittmann, T., Hanada, K., Melancon, P. and Engel, J. N. (2011). Chlamydia trachomatis co-opts GBF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development. *PLoS Pathog* 7(9): e1002198.
- Evseenko, D. A., Paxton, J. W. and Keelan, J. A. (2007). The xenobiotic transporter ABCG2 plays a novel role in differentiation of trophoblast-like BeWo cells. *Placenta* 28 Suppl A: S116-20.
- Fayngerts, S. A., Wu, J., Oxley, C. L., Liu, X., Vourekas, A., Cathopoulos, T., Wang, Z., Cui, J., Liu, S., Sun, H., Lemmon, M. A., Zhang, L., Shi, Y. and Chen, Y. H. (2014). TIPE3 is the transfer protein of lipid second messengers that promote cancer. *Cancer Cell* 26(4): 465-78.
- Fitzgerald, J. S., Germeyer, A., Huppertz, B., Jeschke, U., Knofler, M., Moser, G., Scholz, C., Sonderegger, S., Toth, B. and Markert, U. R. (2010). Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation. *Am J Reprod Immunol* 63(6): 492-505.
- Flores-Martin, J., Rena, V., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G. M. and Genti-Raimondi, S. (2013). The Lipid Transfer Protein StarD7: Structure, Function, and Regulation. *Int J Mol Sci* 14(3): 6170-86.
- Flores-Martin, J., Rena, V., Marquez, S., Panzetta-Dutari, G. M. and Genti-Raimondi, S. (2012). StarD7 Knockdown Modulates ABCG2 Expression, Cell Migration, Proliferation, and Differentiation of Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells. *PLoS One* 7(8): e44152.
- Fluck, C. E., Pandey, A. V., Dick, B., Camats, N., Fernandez-Cancio, M., Clemente, M., Gussinye, M., Carrascosa, A., Mullis, P. E. and Audi, L. (2011). Characterization of novel StAR (steroidogenic acute regulatory protein) mutations causing non-classic lipoid adrenal hyperplasia. *PLoS One* 6(5): e20178.
- Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W., Lin, X., Watkins, S. M., Ivanov, A. R. and Hotamisligil, G. S. (2011). Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 473(7348): 528-31.
- Fuerer, C., Nusse, R. and Ten Berge, D. (2008). Wnt signalling in development and disease. Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease. *EMBO Rep* 9(2): 134-8.
- Gardner, S., Stavrou, E., Rischitor, P. E., Faccenda, E. and Pawson, A. J. (2010). Targeting mediators of Wnt signalling pathways by GnRH in gonadotropes. *J Mol Endocrinol* 44(4): 195-201.
- Getsios, S., Chen, G. T. and MacCalman, C. D. (2000). Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. *J Reprod Fertil* 119(1): 59-68.
- Gomes, C., Oh, S. D., Kim, J. W., Chun, S. Y., Lee, K., Kwon, H. B. and Soh, J. (2005). Expression of the putative sterol binding protein Stard6 gene is male germ cell specific. *Biol Reprod* 72(3): 651-8.
- Guo, L., Ying, W., Zhang, J., Yuan, Y., Qian, X., Wang, J., Yang, X. and He, F. (2010). Tandem affinity purification and identification of the human TSC1 protein complex. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42(4): 266-73.

- Haberkant, P., Raijmakers, R., Wildwater, M., Sachsenheimer, T., Brugger, B., Maeda, K., Houweling, M., Gavin, A. C., Schultz, C., van Meer, G., Heck, A. J. and Holthuis, J. C. (2013). In vivo profiling and visualization of cellular protein-lipid interactions using bifunctional fatty acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(14): 4033-8.
- Haefliger, S., Klebig, C., Schaubitzer, K., Schardt, J., Timchenko, N., Mueller, B. U. and Pabst, T. (2011). Protein disulfide isomerase blocks CEBPA translation and is up-regulated during the unfolded protein response in AML. *Blood* 117(22): 5931-40.
- Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., de Maziere, A. M., Vieira, O. V., Mattjus, P., Klumperman, J., van Meer, G. and Sprong, H. (2007). Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J Cell Biol* 179(1): 101-15.
- Han, S. and Cohen, D. E. (2012). Functional characterization of thioesterase superfamily member 1/Acyl-CoA thioesterase 11: implications for metabolic regulation. *J Lipid Res* 53(12): 2620-31.
- Hanada, K. (2010). Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86(4): 426-37.
- Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N. and Yamaji, T. (2009). CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* 1791(7): 684-91.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426(6968): 803-9.
- Hartley, J. L., Temple, G. F. and Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11): 1788-95.
- Herzog, M., Storch, C. H., Gut, P., Kotlyar, D., Fullekrug, J., Eehalt, R., Haefeli, W. E. and Weiss, J. (2010). Knockdown of caveolin-1 decreases activity of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and increases chemotherapeutic sensitivity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383(1): 1-11.
- Hewitt, D. P., Mark, P. J., Dharmarajan, A. M. and Waddell, B. J. (2006). Placental expression of secreted frizzled related protein-4 in the rat and the impact of glucocorticoid-induced fetal and placental growth restriction. *Biol Reprod* 75(1): 75-81.
- Higa, A. and Chevet, E. (2012). Redox signaling loops in the unfolded protein response. *Cell Signal* 24(8): 1548-55.
- Higashikuni, Y., Sainz, J., Nakamura, K., Takaoka, M., Enomoto, S., Iwata, H., Sahara, M., Tanaka, K., Koibuchi, N., Ito, S., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., Hirata, Y., Nagai, R. and Sata, M. (2010). The ATP-binding cassette transporter BCRP1/ABCG2 plays a pivotal role in cardiac repair after myocardial infarction via modulation of microvascular endothelial cell survival and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(11): 2128-35.
- Hilvo, M., Denkert, C., Lehtinen, L., Muller, B., Brockmoller, S., Seppanen-Laakso, T., Budczies, J., Bucher, E., Yetukuri, L., Castillo, S., Berg, E., Nygren, H., Sysi-Aho, M., Griffin, J. L., Fiehn, O., Loibl, S., Richter-Ehrenstein, C., Radke, C., Hyotylainen, T., Kallioniemi, O., Iljin, K. and Oresic, M. (2011). Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res* 71(9): 3236-45.
- Holthuis, J. C. and Levine, T. P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(3): 209-20.
- Holthuis, J. C. and Menon, A. K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510(7503): 48-57.
- Hori, S., Ohtsuki, S., Ichinowatari, M., Yokota, T., Kanda, T. and Terasaki, T. (2005). Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. *J Neurochem* 93(1): 63-71.
- Horibata, Y. and Sugimoto, H. (2010). StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria. *J Biol Chem* 285(10): 7358-7365.
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V. and Sullivan, M. (2012). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* 40(Database issue): D261-70.

- Hossain, A. and Saunders, G. F. (2003). Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Mullerian inhibiting substance type II receptor. *J Biol Chem* 278(29): 26511-6.
- Hsu, C. D., Chan, D. W., Iriye, B., Johnson, T. R., Hong, S. F. and Repke, J. T. (1994). Elevated serum human chorionic gonadotropin as evidence of secretory response in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 170(4): 1135-8.
- Hu, C., Li, H., Li, J., Zhu, Z., Yin, S., Hao, X., Yao, M., Zheng, S. and Gu, J. (2008). Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis* 29(12): 2289-97.
- Hubner, M. and Peter, M. (2012). Cullin-3 and the endocytic system: New functions of ubiquitination for endosome maturation. *Cell Logist* 2(3): 166-168.
- Huppertz, B. and Borges, M. (2008). Placenta trophoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475: 135-47.
- Huppertz, B., Kadyrov, M. and Kingdom, J. C. (2006). Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 195(1): 29-39.
- Ikeda, Y., Tanji, E., Makino, N., Kawata, S. and Furukawa, T. (2011). MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* 10(2): 259-269.
- Ito, M., Yamanashi, Y., Toyoda, Y., Izumi-Nakaseko, H., Oda, S., Sugiyama, A., Kuroda, M., Suzuki, H., Takada, T. and Adachi-Akahane, S. (2013). Disruption of Stard10 gene alters the PPARalpha-mediated bile acid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1831(2): 459-68.
- Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., Kafri, R., Kirschner, M. W., Clish, C. B. and Mootha, V. K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* 336(6084): 1040-4.
- Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Stolovitzky, G. A., Iturria, S. J., Tu, Y., Lepre, J., Shah, N. and Kay, N. E. (2003). Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res* 1(5): 346-61.
- Jerez-Timaure, N. C., Kearney, F., Simpson, E. B., Eisen, E. J. and Pomp, D. (2004). Characterization of QTL with major effects on fatness and growth on mouse chromosome 2. *Obes Res* 12(9): 1408-20.
- Johnstone, E. D., Chan, G., Sibley, C. P., Davidge, S. T., Lowen, B. and Guilbert, L. J. (2005). Sphingosine-1-phosphate inhibition of placental trophoblast differentiation through a G(i)-coupled receptor response. *J Lipid Res* 46(9): 1833-9.
- Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., Elliott, M. R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., Kensler, T., Ravichandran, K. S., Isakson, B. E., Wamhoff, B. R. and Leitinger, N. (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 107(6): 737-46.
- Kang, H. W., Ribich, S., Kim, B. W., Hagen, S. J., Bianco, A. C. and Cohen, D. E. (2009). Mice lacking Pctp/StarD2 exhibit increased adaptive thermogenesis and enlarged mitochondria in brown adipose tissue. *J Lipid Res* 50(11): 2212-21.
- Kang, H. W., Wei, J. and Cohen, D. E. (2010). PC-TP/StARD2: Of membranes and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 21(7): 449-56.
- Kanno, K., Wu, M. K., Agate, D. S., Fanelli, B. J., Wagle, N., Scapa, E. F., Ukomadu, C. and Cohen, D. E. (2007). Interacting proteins dictate function of the minimal START domain phosphatidylcholine transfer protein/StarD2. *J Biol Chem* 282(42): 30728-36.
- Kawai, K., Kiyota, M., Seike, J., Deki, Y. and Yagisawa, H. (2007). START-GAP3/DLC3 is a GAP for RhoA and Cdc42 and is localized in focal adhesions regulating cell morphology. *Biochem Biophys Res Commun* 364(4): 783-9.
- Kawai, K., Seike, J., Iino, T., Kiyota, M., Iwamae, Y., Nishitani, H. and Yagisawa, H. (2009). START-GAP2/DLC2 is localized in focal adhesions via its N-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun* 380(4): 736-41.
- Kawai, K., Yamaga, M., Iwamae, Y., Kiyota, M., Kamata, H., Hirata, H., Homma, Y. and Yagisawa, H. (2004). A PLCdelta1-binding protein, p122RhoGAP, is localized in focal adhesions. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 1107-9.

- Kerr, I. D., Haider, A. J. and Gelissen, I. C. (2011). The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *Br J Pharmacol* 164(7): 1767-79.
- Kharfi, A., Giguere, Y., De Grandpre, P., Moutquin, J. M. and Forest, J. C. (2005). Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem* 38(8): 717-21.
- Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M. E., Rad, R., Rush, J., Comb, M. J., Harper, J. W. and Gygi, S. P. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell* 44(2): 325-40.
- Kimata, Y., Ooboki, K., Nomura-Furuwatari, C., Hosoda, A., Tsuru, A. and Kohno, K. (2000). Identification of a novel mammalian endoplasmic reticulum-resident KDEL protein using an EST database motif search. *Gene* 261(2): 321-7.
- King, S. R., Bhangoo, A. and Stocco, D. M. (2011). Functional and physiological consequences of StAR deficiency: role in lipid congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev* 20: 47-53.
- Kirkby, B., Roman, N., Kobe, B., Kellie, S. and Forwood, J. K. (2010). Functional and structural properties of mammalian acyl-coenzyme A thioesterases. *Prog Lipid Res* 49(4): 366-77.
- Kishida, T., Kostetskii, I., Zhang, Z., Martinez, F., Liu, P., Walkley, S. U., Dwyer, N. K., Blanchette-Mackie, E. J., Radice, G. L. and Strauss, J. F., 3rd (2004). Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *J Biol Chem* 279(18): 19276-85.
- Knofler, M. and Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet* 4: 190.
- Kostek, M. C., Chen, Y. W., Cuthbertson, D. J., Shi, R., Fedele, M. J., Esser, K. A. and Rennie, M. J. (2007). Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. *Physiol Genomics* 31(1): 42-52.
- Krueger, R. J. and Orme-Johnson, N. R. (1983). Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J Biol Chem* 258(16): 10159-67.
- Kudo, N., Kumagai, K., Tomishige, N., Yamaji, T., Wakatsuki, S., Nishijima, M., Hanada, K. and Kato, R. (2008). Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2): 488-93.
- Kumagai, K., Yasuda, S., Okemoto, K., Nishijima, M., Kobayashi, S. and Hanada, K. (2005). CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J Biol Chem* 280(8): 6488-95.
- Lagace, T. A. and Ridgway, N. D. (2013). The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833(11): 2499-510.
- Lai, E., Teodoro, T. and Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22: 193-201.
- Lavoie, H. A. and King, S. R. (2009). Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(8): 880-907.
- Lee, A. J., Roylance, R., Sander, J., Gorman, P., Endesfelder, D., Kschischo, M., Jones, N. P., East, P., Nicke, B., Spassieva, S., Obeid, L. M., Birkbak, N. J., Szallasi, Z., McKnight, N. C., Rowan, A. J., Speirs, V., Hanby, A. M., Downward, J., Toozé, S. A. and Swanton, C. (2012). CERT depletion predicts chemotherapy benefit and mediates cytotoxic and polyploid-specific cancer cell death through autophagy induction. *J Pathol* 226(3): 482-94.
- Lee, H. S., Park, M. H., Yang, S. J., Park, K. C., Kim, N. S., Kim, Y. S., Kim, D. I., Yoo, H. S., Choi, E. J. and Yeom, Y. I. (2007). Novel candidate targets of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Life Sci* 80(7): 690-8.
- Leman, E. S., Magheli, A., Yong, K. M., Netto, G., Hinz, S. and Getzenberg, R. H. (2009). Identification of nuclear structural protein alterations associated with seminomas. *J Cell Biochem* 108(6): 1274-1279.
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10): 739-50.

- Lev, S. (2012). Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(10).
- Leventis, P. A. and Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39: 407-27.
- Levine, T. and Loewen, C. (2006). Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* 18(4): 371-8.
- Levytska, K., Kingdom, J., Baczyk, D. and Drewlo, S. (2013). Heme oxygenase-1 in placental development and pathology. *Placenta* 34(4): 291-8.
- Li, H., Jin, H. E., Kim, W., Han, Y. H., Kim, D. D., Chung, S. J. and Shim, C. K. (2008). Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. *Pharm Res* 25(11): 2601-12.
- Li, W. T., Zhou, G. Y., Song, X. R., Chi, W. L., Ren, R. M. and Wang, X. W. (2005). Modulation of BCRP mediated atypical multidrug resistance phenotype by RNA interference. *Neoplasma* 52(3): 219-24.
- Li, Y. T., Chua, M. J., Kunnath, A. P. and Chowdhury, E. H. (2012). Reversing multidrug resistance in breast cancer cells by silencing ABC transporter genes with nanoparticle-facilitated delivery of target siRNAs. *Int J Nanomedicine* 7: 2473-81.
- Liao, Y. C. and Lo, S. H. (2008). Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver. *Int J Biochem Cell Biol* 40(5): 843-7.
- Liao, Y. C., Si, L., deVere White, R. W. and Lo, S. H. (2007). The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1. *J Cell Biol* 176(1): 43-9.
- Lin, Y. H., Chang, H. M., Chang, F. P., Shen, C. R., Liu, C. L., Mao, W. Y., Lin, C. C., Lee, H. S. and Shen, C. N. (2013). Protoporphyrin IX accumulation disrupts mitochondrial dynamics and function in ABCG2-deficient hepatocytes. *FEBS Lett* 587(19): 3202-9.
- Litvak, V., Shaul, Y. D., Shulewitz, M., Amarilio, R., Carmon, S. and Lev, S. (2002). Targeting of Nir2 to lipid droplets is regulated by a specific threonine residue within its PI-transfer domain. *Curr Biol* 12(17): 1513-8.
- Loregger, T., Pollheimer, J. and Knofler, M. (2003). Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast--a review. *Placenta* 24 Suppl A: S104-10.
- Lukasik, D., Wilczek, E., Wasiutynski, A. and Gornicka, B. (2011). Deleted in liver cancer protein family in human malignancies (Review). *Oncol Lett* 2(5): 763-768.
- Lv, H., He, Z., Liu, X., Yuan, J., Yu, Y. and Chen, Z. (2007). Reversal of BCRP-mediated multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs. *J Cell Biochem* 102(1): 75-81.
- MacLaren, R., Cui, W., Simard, S. and Cianflone, K. (2008). Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 49(2): 308-23.
- Mandl, J., Meszaros, T., Banhegyi, G. and Csala, M. (2013). Minireview: endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. *Mol Endocrinol* 27(3): 384-93.
- Marsh, D. (2007). Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* 93(11): 3884-99.
- Maurel, M. and Chevet, E. (2013). Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am J Physiol Cell Physiol* 304(12): C1117-26.
- Mesmin, B., Antonny, B. and Drin, G. (2013). Insights into the mechanisms of sterol transport between organelles. *Cell Mol Life Sci* 70(18): 3405-21.
- Mesmin, B. and Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1791(7): 636-45.
- Metzger, T., Kleiss, C. and Sumara, I. (2013). CUL3 and protein kinases: insights from PLK1/KLHL22 interaction. *Cell Cycle* 12(14): 2291-6.
- Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 15(9): 467-76.

- Mizusaki, H., Kawabe, K., Mukai, T., Ariyoshi, E., Kasahara, M., Yoshioka, H., Swain, A. and Morohashi, K. (2003). Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 17(4): 507-19.
- Moon, J. L., Kim, S. Y., Shin, S. W. and Park, J. W. (2012). Regulation of brefeldin A-induced ER stress and apoptosis by mitochondrial NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 417(2): 760-4.
- Morohashi, K., Hatano, O., Nomura, M., Takayama, K., Hara, M., Yoshii, H., Takakusu, A. and Omura, T. (1995). Function and distribution of a steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 81-8.
- Mulholland, D. J., Dedhar, S., Coetzee, G. A. and Nelson, C. C. (2005). Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 26(7): 898-915.
- Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshiba, S. and Ishikawa, T. (2009). Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J* 276(24): 7237-52.
- Nakanishi, T. and Ross, D. D. (2012). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer* 31(2): 73-99.
- Nayeem, S. B., Arfuso, F., Dharmarajan, A. and Keelan, J. A. (2014). Role of Wnt signalling in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev*.
- Ning, Y., Bai, Q., Lu, H., Li, X., Pandak, W. M., Zhao, F., Chen, S., Ren, S. and Yin, L. (2009a). Overexpression of mitochondrial cholesterol delivery protein, StAR, decreases intracellular lipids and inflammatory factors secretion in macrophages. *Atherosclerosis* 204(1): 114-20.
- Ning, Y., Xu, L., Ren, S., Pandak, W. M., Chen, S. and Yin, L. (2009b). StAR overexpression decreases serum and tissue lipids in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids* 44(6): 511-9.
- Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J. and Sugimoto, Y. (2009). Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev* 61(1): 26-33.
- Okamoto, A., Chikamatsu, K., Sakakura, K., Hatsushika, K., Takahashi, G. and Masuyama, K. (2009). Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 45(7): 633-9.
- Olayioye, M. A., Vehring, S., Muller, P., Herrmann, A., Schiller, J., Thiele, C., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. and Pomorski, T. (2005). StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 280(29): 27436-42.
- Olkonen, V. M. and Li, S. (2013). Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. *Prog Lipid Res* 52(4): 529-38.
- Parakh, T. N., Hernandez, J. A., Grammer, J. C., Weck, J., Hunzicker-Dunn, M., Zeleznik, A. J. and Nilson, J. H. (2006). Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12435-40.
- Park, C. C., Gale, G. D., de Jong, S., Ghazalpour, A., Bennett, B. J., Farber, C. R., Langfelder, P., Lin, A., Khan, A. H., Eskin, E., Horvath, S., Lusk, A. J., Ophoff, R. A. and Smith, D. J. (2011). Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol* 5: 43.
- Parker, K. L., Rice, D. A., Lala, D. S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N. A., Stallings, N. and Schimmer, B. P. (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 57: 19-36.
- Patel, K. J., Tredan, O. and Tannock, I. F. (2013). Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(1): 127-38.
- Penno, A., Hackenbroich, G. and Thiele, C. (2012). Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*.
- Pheasant, T. J., Parry, L., Reed, K. R., Ewan, K. B., Dale, T. C., Sansom, O. J. and Clarke, A. R. (2008). Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 28(19): 6094-103.

- Piao, H. and Mayinger, P. (2012). Growth and metabolic control of lipid signalling at the Golgi. *Biochem Soc Trans* 40(1): 205-9.
- Polyak, K. and Hu, M. (2005). Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10(3): 231-47.
- Pollheimer, J., Loregger, T., Sonderegger, S., Saleh, L., Bauer, S., Bilban, M., Czerwenka, K., Husslein, P. and Knofler, M. (2006). Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am J Pathol* 168(4): 1134-47.
- Priebsch, A., Rompe, F., Tonnies, H., Kowalski, P., Surowiak, P., Stege, A., Materna, V. and Lage, H. (2006). Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. *Oligonucleotides* 16(3): 263-74.
- Prinz, W. A. (2010). Lipid trafficking sans vesicles: where, why, how? *Cell* 143(6): 870-4.
- Prouillac, C. and Lecoœur, S. (2010). The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos* 38(10): 1623-35.
- Qiu, Y., Zhang, Z. Y., Du, W. D., Ye, L., Xu, S., Zuo, X. B., Zhou, F. S., Chen, G., Ma, X. L., Schneider, M. E., Xia, H. Z., Zhou, Y., Wu, J. F., Yuan-Hong, X. and Zhang, X. J. (2014). Association analysis of ERBB2 amplicon genetic polymorphisms and STARD3 expression with risk of gastric cancer in the Chinese population. *Gene* 535(2): 225-32.
- Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L., McDonald, J. G. and Brown, M. S. (2008). Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab* 8(6): 512-21.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 23-36.
- Rena, V., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G. and Genti-Raimondi, S. (2009). Activation of beta-catenin signalling increases StarD7 gene expression in JEG-3 cells. *Placenta* 30(10): 876-83.
- Rena, V., Flores-Martín, J., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G. and Genti-Raimondi, S. (2010). Convergence of β -catenin signalling and SF-1 transcription factor on StarD7 gene promoter. *Placenta* 31(9): A38.
- Rena, V., Flores-Martín, J., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G. and Genti-Raimondi, S. (2011). StarD7 gene expression in trophoblast cells: Contribution of SF-1 and Wnt-b-catenin signalling. *Molecular Endocrinology* 8: 1364-1375.
- Ridgway, N. D. (2013). The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48(1): 20-38.
- Riegelhaupt, J. J., Waase, M. P., Garbarino, J., Cruz, D. E. and Breslow, J. L. (2010). Targeted disruption of steroidogenic acute regulatory protein D4 leads to modest weight reduction and minor alterations in lipid metabolism. *J Lipid Res* 51(5): 1134-43.
- Robey, R. W., Honjo, Y., van de Laar, A., Miyake, K., Regis, J. T., Litman, T. and Bates, S. E. (2001). A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochim Biophys Acta* 1512(2): 171-82.
- Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Hylemon, P. B., Montanez, R., Redford, K., Natarajan, R., Medina, M. A., Gil, G. and Pandak, W. M. (2006). Localization of StarD5 cholesterol binding protein. *J Lipid Res* 47(6): 1168-75.
- Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Hylemon, P. B., Redford, K., Natarajan, R., Del Castillo, A., Gil, G. and Pandak, W. M. (2005). Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein. *J Lipid Res* 46(8): 1615-23.
- Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Wong, E., Marques, D., Redford, K., Gil, G., Hylemon, P. and Pandak, W. M. (2008). Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. *J Lipid Res* 49(7): 1409-19.
- Rodriguez, M., Li, S. S., Harper, J. W. and Songyang, Z. (2004). An oriented peptide array library (OPAL) strategy to study protein-protein interactions. *J Biol Chem* 279(10): 8802-7.

- Rome, S., Clement, K., Rabasa-Lhoret, R., Loizon, E., Poitou, C., Barsh, G. S., Riou, J. P., Laville, M. and Vidal, H. (2003). Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. *J Biol Chem* 278(20): 18063-8.
- Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-29.
- Rosenbaum, A. I. and Maxfield, F. R. (2011). Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *J Neurochem* 116(5): 789-95.
- Roy, L., McDonald, C. A., Jiang, C., Maroni, D., Zeleznik, A. J., Wyatt, T. A., Hou, X. and Davis, J. S. (2009). Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology* 150(11): 5036-45.
- Salisbury, T. B., Binder, A. K. and Nilson, J. H. (2008). Welcoming beta-catenin to the gonadotropin-releasing hormone transcriptional network in gonadotropes. *Mol Endocrinol* 22(6): 1295-303.
- Samadi, N., Bekele, R., Capatos, D., Venkatraman, G., Sariahmetoglu, M. and Brindley, D. N. (2011). Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie* 93(1): 61-70.
- Samarzija, I., Sini, P., Schlange, T., Macdonald, G. and Hynes, N. E. (2009). Wnt3a regulates proliferation and migration of HUVEC via canonical and non-canonical Wnt signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 386(3): 449-54.
- Santolla, M. F., Lappano, R., De Marco, P., Pupo, M., Vivacqua, A., Sisci, D., Abonante, S., Iacopetta, D., Cappello, A. R., Dolce, V. and Maggiolini, M. (2012). G protein-coupled estrogen receptor mediates the up-regulation of fatty acid synthase induced by 17 β -estradiol in cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *J Biol Chem* 287(52): 43234-45.
- Sarri, E., Sicart, A., Lazaro-Dieguez, F. and Egea, G. (2011). Phospholipid synthesis participates in the regulation of diacylglycerol required for membrane trafficking at the Golgi complex. *J Biol Chem* 286(32): 28632-43.
- Scapa, E. F., Poci, A., Wu, M. K., Gutierrez-Juarez, R., Glenz, L., Kanno, K., Li, H., Biddinger, S., Jelicks, L. A., Rossetti, L. and Cohen, D. E. (2008). Regulation of energy substrate utilization and hepatic insulin sensitivity by phosphatidylcholine transfer protein/StarD2. *FASEB J* 22(7): 2579-90.
- Selman, M., Pardo, A., Barrera, L., Estrada, A., Watson, S. R., Wilson, K., Aziz, N., Kaminski, N. and Zlotnik, A. (2006). Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 173(2): 188-98.
- Shen, S., Callaghan, D., Juzwik, C., Xiong, H., Huang, P. and Zhang, W. (2010). ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 114(6): 1590-604.
- Singh, A. T., Dharmarajan, A., Aye, I. L. and Keelan, J. A. (2012). Sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization. *Reprod Biomed Online* 24(2): 224-34.
- Soccio, R. E., Adams, R. M., Maxwell, K. N. and Breslow, J. L. (2005). Differential gene regulation of StarD4 and StarD5 cholesterol transfer proteins. Activation of StarD4 by sterol regulatory element-binding protein-2 and StarD5 by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 280(19): 19410-8.
- Soccio, R. E. and Breslow, J. L. (2003). StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem* 278(25): 22183-6.
- Sokolovic, M., Sokolovic, A., van Roomen, C. P., Gruber, A., Ottenhoff, R., Scheij, S., Hakvoort, T. B., Lamers, W. H. and Groen, A. K. (2010). Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis--transcriptomic and lipid profiling. *J Hepatol* 52(5): 737-44.
- Sonderegger, S., Haslinger, P., Sabri, A., Leisser, C., Otten, J. V., Fiala, C. and Knofler, M. (2010a). Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion

- through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. *Endocrinology* 151(1): 211-20.
- Sonderegger, S., Husslein, H., Leisser, C. and Knofler, M. (2007). Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes. *Placenta* 28 Suppl A: S97-102.
- Sonderegger, S., Pollheimer, J. and Knofler, M. (2010b). Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review. *Placenta* 31(10): 839-47.
- Song, J., Chang, I., Chen, Z., Kang, M. and Wang, C. Y. (2010). Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One* 5(7): e11456.
- Spee, B., Carpino, G., Schotanus, B. A., Katoonizadeh, A., Vander Borgh, S., Gaudio, E. and Roskams, T. (2010). Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* 59(2): 247-57.
- Stacy, A. E., Jansson, P. J. and Richardson, D. R. (2013). Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance. *Mol Pharmacol* 84(5): 655-69.
- Steen, H. and Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 699-711.
- Stocco, D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63: 193-213.
- Suematsu, N. and Isohashi, F. (2006). Molecular cloning and functional expression of human cytosolic acetyl-CoA hydrolase. *Acta Biochim Pol* 53(3): 553-61.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R. and Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(18): 2649-59.
- Swanton, C., Marani, M., Pardo, O., Warne, P. H., Kelly, G., Sahai, E., Elustondo, F., Chang, J., Temple, J., Ahmed, A. A., Brenton, J. D., Downward, J. and Nicke, B. (2007). Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell* 11(6): 498-512.
- Takabe, K., Paugh, S. W., Milstien, S. and Spiegel, S. (2008). "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 60(2): 181-95.
- Tauber, S., Jais, A., Jeitler, M., Haider, S., Husa, J., Lindroos, J., Knofler, M., Mayerhofer, M., Pehamberger, H., Wagner, O. and Bilban, M. (2010). Transcriptome analysis of human cancer reveals a functional role of heme oxygenase-1 in tumor cell adhesion. *Mol Cancer* 9: 200.
- Telbisz, A., Muller, M., Ozvegy-Laczka, C., Homolya, L., Szenté, L., Varadi, A. and Sarkadi, B. (2007). Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* 1768(11): 2698-713.
- Testerink, N., van der Sanden, M. H., Houweling, M., Helms, J. B. and Vaandrager, A. B. (2009). Depletion of phosphatidylcholine affects endoplasmic reticulum morphology and protein traffic at the Golgi complex. *J Lipid Res* 50(11): 2182-92.
- Thorsell, A. G., Lee, W. H., Persson, C., Siponen, M. I., Nilsson, M., Busam, R. D., Kotenyova, T., Schuler, H. and Lehtio, L. (2011). Comparative structural analysis of lipid binding START domains. *PLoS One* 6(6): e19521.
- Tomasetto, C., Regnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M. G., Chenard, M. P., Lidereau, R., Basset, P. and Rio, M. C. (1995). 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(3): 367-76.
- Torres, J. Z., Summers, M. K., Peterson, D., Brauer, M. J., Lee, J., Senese, S., Gholkar, A. A., Lo, Y. C., Lei, X., Jung, K., Anderson, D. C., Davis, D. P., Belmont, L. and Jackson, P. K. (2011). The STARD9/Kif16a kinesin associates with mitotic microtubules and regulates spindle pole assembly. *Cell* 147(6): 1309-23.
- Toulmay, A. and Prinz, W. A. (2011). Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg. *Curr Opin Cell Biol* 23(4): 458-63.

- Townley, A. K., Feng, Y., Schmidt, K., Carter, D. A., Porter, R., Verkade, P. and Stephens, D. J. (2008). Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COPII-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *J Cell Sci* 121(Pt 18): 3025-34.
- Travis, A. J. and Kopf, G. S. (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110(6): 731-6.
- Tsai, L. L., Yu, C. C., Chang, Y. C., Yu, C. H. and Chou, M. Y. (2011). Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 40(8): 621-8.
- Tsujishita, Y. and Hurley, J. H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol* 7(5): 408-14.
- Vaitukaitis, J. L. and Ebersole, E. R. (1976). Evidence for altered synthesis of human chorionic gonadotropin in gestational trophoblastic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 42(6): 1048-55.
- van der Sanden, M. H., Houweling, M., van Golde, L. M. and Vaandrager, A. B. (2003). Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* 369(Pt 3): 643-50.
- van Meer, G. and de Kroon, A. I. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci* 124(Pt 1): 5-8.
- van Meer, G., Halter, D., Sprong, H., Somerharju, P. and Egmond, M. R. (2006). ABC lipid transporters: extruders, flippases, or floppless activators? *FEBS Lett* 580(4): 1171-7.
- van Meer, G., Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2): 112-24.
- van Ooij, C., Withers-Martinez, C., Ringel, A., Cockcroft, S., Haldar, K. and Blackman, M. J. (2013). Identification of a *Plasmodium falciparum* phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 288(44): 31971-83.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. and Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 3(3): 281-90.
- Vetter, G., Saumet, A., Moes, M., Vallar, L., Le Behec, A., Laurini, C., Sabbah, M., Arar, K., Theillet, C., Lecellier, C. H. and Friederich, E. (2010). miR-661 expression in SNAI1-induced epithelial to mesenchymal transition contributes to breast cancer cell invasion by targeting Nectin-1 and StarD10 messengers. *Oncogene* 29(31): 4436-48.
- Voelker, D. R. (2009). Genetic and biochemical analysis of non-vesicular lipid traffic. *Annu Rev Biochem* 78: 827-56.
- Wada, K., Howard, J. T., McConnell, P., Whitney, O., Lints, T., Rivas, M. V., Horita, H., Patterson, M. A., White, S. A., Scharff, C., Haesler, S., Zhao, S., Sakaguchi, H., Hagiwara, M., Shiraki, T., Hirozane-Kishikawa, T., Skene, P., Hayashizaki, Y., Carninci, P. and Jarvis, E. D. (2006). A molecular neuroethological approach for identifying and characterizing a cascade of behaviorally regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41): 15212-7.
- Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Furukawa, T., Nakagawa, H. and Ishikawa, T. (2009). Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv Drug Deliv Rev* 61(1): 66-72.
- Wang, F., Xue, X., Wei, J., An, Y., Yao, J., Cai, H., Wu, J., Dai, C., Qian, Z., Xu, Z. and Miao, Y. (2010). hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations. *Br J Cancer* 103(4): 567-74.
- Wang, X., Rao, R. P., Kosakowska-Cholody, T., Masood, M. A., Southon, E., Zhang, H., Berthet, C., Nagashim, K., Veenstra, T. K., Tessarollo, L., Acharya, U. and Acharya, J. K. (2009). Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice. *J Cell Biol* 184(1): 143-58.
- Wiese, A. H., Auer, J., Lassmann, S., Nahrig, J., Rosenberg, R., Hofler, H., Ruger, R. and Werner, M. (2007). Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev* 31(4): 282-95.
- Wirtz, K. W. (1991). Phospholipid transfer proteins: from lipid monolayers to cells. *Klin Wochenschr* 69(3): 105-11.
- Wirtz, K. W. (2006). Phospholipid transfer proteins in perspective. *FEBS Lett* 580(23): 5436-41.

- Wirtz, K. W., Schouten, A. and Gros, P. (2006). Phosphatidylinositol transfer proteins: from closed for transport to open for exchange. *Adv Enzyme Regul* 46: 301-11.
- Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H. and Herrmann, A. (2003). Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J* 376(Pt 2): 489-95.
- Wong, N. C., Novakovic, B., Weinrich, B., Dewi, C., Andronikos, R., Sibson, M., Macrae, F., Morley, R., Pertile, M. D., Craig, J. M. and Saffery, R. (2008). Methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human placenta and hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Cancer Lett* 268(1): 56-62.
- Wright, H. J., Matthews, J. B., Chapple, I. L., Ling-Mountford, N. and Cooper, P. R. (2008). Periodontitis associates with a type 1 IFN signature in peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 181(8): 5775-84.
- Wu, Q., Huang, J. H., Sampson, E. R., Kim, K. O., Zuscik, M. J., O'Keefe, R. J., Chen, D. and Rosier, R. N. (2009). Smurf2 induces degradation of GSK-3beta and upregulates beta-catenin in chondrocytes: a potential mechanism for Smurf2-induced degeneration of articular cartilage. *Exp Cell Res* 315(14): 2386-98.
- Xi, Y., Nakajima, G., Schmitz, J. C., Chu, E. and Ju, J. (2006). Multi-level gene expression profiles affected by thymidylate synthase and 5-fluorouracil in colon cancer. *BMC Genomics* 7: 68.
- Yamamoto, K., Hamada, H., Shinkai, H., Kohno, Y., Koseki, H. and Aoe, T. (2003). The KDEL receptor modulates the endoplasmic reticulum stress response through mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *J Biol Chem* 278(36): 34525-32.
- Yamanaka, M., Koga, M., Tanaka, H., Nakamura, Y., Ohta, H., Yomogida, K., Tsuchida, J., Iguchi, N., Nojima, H., Nozaki, M., Matsumiya, K., Okuyama, A., Toshimori, K. and Nishimune, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of phosphatidylcholine transfer protein-like protein gene expressed in murine haploid germ cells. *Biol Reprod* 62(6): 1694-1701.
- Yau, T. O., Leung, T. H., Lam, S., Cheung, O. F., Tung, E. K., Khong, P. L., Lam, A., Chung, S. and Ng, I. O. (2009). Deleted in liver cancer 2 (DLC2) was dispensable for development and its deficiency did not aggravate hepatocarcinogenesis. *PLoS One* 4(8): e6566.
- Yin, T., Wei, H., Gou, S., Shi, P., Yang, Z., Zhao, G. and Wang, C. (2011). Cancer stem-like cells enriched in panc-1 spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine. *Int J Mol Sci* 12(3): 1595-604.
- Yung, C. K., Halperin, V. L., Tomaselli, G. F. and Winslow, R. L. (2004). Gene expression profiles in end-stage human idiopathic dilated cardiomyopathy: altered expression of apoptotic and cytoskeletal genes. *Genomics* 83(2): 281-97.
- Zhang, Y., Li, Y., Niepel, M. W., Kawano, Y., Han, S., Liu, S., Marsili, A., Larsen, P. R., Lee, C. H. and Cohen, D. E. (2012). Targeted deletion of thioesterase superfamily member 1 promotes energy expenditure and protects against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(14): 5417-22.
- Zhong, D., Zhang, J., Yang, S., Soh, U. J., Buschdorf, J. P., Zhou, Y. T., Yang, D. and Low, B. C. (2009). The SAM domain of the RhoGAP DLC1 binds EF1A1 to regulate cell migration. *J Cell Sci* 122(Pt 3): 414-24.
- Zhu, X. M., Han, T., Sargent, I. L., Yin, G. W. and Yao, Y. Q. (2009). Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 200(6): 661 e1-7.
- Zhu, Y., Liu, X. J., Yang, P., Zhao, M., Lv, L. X., Zhang, G. D., Wang, Q. and Zhang, L. (2014). Alkylglyceronephosphate synthase (AGPS) alters lipid signaling pathways and supports chemotherapy resistance of glioma and hepatic carcinoma cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(7): 3219-26.
- Zimonjic, D. B. and Popescu, N. C. (2012). Role of DLC1 tumor suppressor gene and MYC oncogene in pathogenesis of human hepatocellular carcinoma: potential prospects for combined targeted therapeutics (review). *Int J Oncol* 41(2): 393-406.