



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Memoria para Optar al Título Profesional de Bioquímica

**Estudio farmacogenético en *Saccharomyces cerevisiae*:
Identificación de genes moduladores de la respuesta a
Rapamicina en la enfermedad de Niemann Pick tipo C**

Pinkus Benjamín Szenfeld Espinosa

Director

Andrés D. Klein, Ph.D.

Centro de Genética y Genómica
Instituto de Ciencias e Innovación en
Medicina (ICIM)
Facultad de Medicina
Universidad del Desarrollo

Patrocinante

Sergio Álvarez, Ph.D.

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Julio, 2023

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por FONDECYT N°1230317 (A.D.K.) (2023–2027), NPSuisse (2022-2023) y Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) grant CRP/CHL22-02 (2023-2026).

Agradecimientos

Me gustaría comenzar expresando mi más sincero agradecimiento al profesor Andrés Klein por brindarme la invaluable oportunidad de trabajar en su laboratorio. Su confianza en mí, paciencia, apoyo constante y retroalimentación han sido fundamentales para el éxito de este proyecto.

También quisiera mencionar al gran equipo de investigación que me ha acompañado en todo este proceso. Agradezco a Valeria Olguín por ayudarme a adaptarme al laboratorio desde el principio, Macarena Las Heras y Juan Carlos Rubilar por contribuir a mantener un ambiente de trabajo agradable y colaborativo, brindándome su experiencia y ofreciendo siempre críticas constructivas. Han sido una fuente de aprendizaje y motivación en este camino, además, compartimos buenas conversaciones donde las risas nunca faltaron.

Me gustaría agradecer al profesor Boris Rebolledo por su buena disposición para apoyarme en la bioinformática presente en este trabajo y ayudándome a comprender los métodos.

Quiero extender mi gratitud a la comisión evaluadora, conformada por los profesores Sergio Álvarez, Sergio Lobos y Valentina Parra. Agradezco su dedicada revisión a este trabajo, para fortalecer esta investigación con su criterio. Además, por contribuir a mi formación como futuro profesional en sus cursos durante pregrado.

También me gustaría agradecer a mis amigos y compañeros por su apoyo en todo momento, me brindaron ánimo y estuvieron presentes en los momentos más demandantes. Aunque no los nombre directamente, quiero que sepan que los valoro profundamente.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi profunda gratitud a mi familia, especialmente a mis padres. Gracias por su amor y apoyo incondicional en todo momento. Gracias por apoyar la elección de mi carrera y mantener un interés genuino en ella. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible.

Índice de Contenidos

Financiamiento.....	I
Agradecimientos.....	I
Abreviaturas	V
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
Introducción	1
Trastornos de almacenamiento lisosomal	1
Niemann Pick tipo C como LSD	1
Métodos de Diagnóstico de NPC.....	6
El papel central de la proteína TOR en la supervivencia celular.....	7
Resultados contradictorios en el uso de Rapa como tratamiento de NPC	9
La droga U18666A en el modelamiento de NPC	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio de NPC	12
Hipótesis	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
Metodología.....	16
Cepas parentales de <i>S. cerevisiae</i>	16
Obtención de Curvas de Crecimiento.....	17
Marcación con FM4-64 y Microscopía Confocal.....	18
Tinción de Filipina y Microscopía de Fluorescencia.....	19
Mapeo cuantitativo de locus de rasgos a través de ligamiento genético.....	19
Análisis y selección de potenciales genes moduladores de la respuesta a Rapa	20
Análisis Estadísticos.....	21
Resultados.....	22
Rapa ejerce una respuesta diferencial en cepas parentales de <i>S. cerevisiae</i> tratadas con U18.....	22
Diferencias encontradas en la fragmentación vacuolar y acumulación de ergosterol. ...	31
Genes moduladores del efecto de Rapa.	37
Discusión	45
La variabilidad en la patología y respuesta a tratamientos en NPC	45
La importancia de la autofagia en la enfermedad de NPC.....	46

Equilibrio entre fisión y fusión de vacuolas en la enfermedad de NPC y su modulación por Rapa	50
AVO2 y STV1: posibles genes moduladores de la respuesta a Rapa con respecto a U18	51
Conclusiones.....	55
Proyecciones.....	55
Referencias	56

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Modelo de transferencia de colesterol y esfingolípidos derivado de LDL a la membrana lisosomal mediada por NPC1 y NPC2.....	3
Figura 2. Incremento en la tinción con LysoTracker en fibroblastos NPC humanos	4
Figura 3. Variabilidad fenotípica en NPC.....	5
Figura 4. LysoTracker como biomarcador de la edad de inicio de los síntomas en NPC....	6
Figura 5. Tinción de Filipina como método de diagnóstico de NPC.....	7
Figura 6. Principales componentes moleculares, señales detectadas y procesos regulados por mTORC1 y mTORC2	9
Figura 7. Efecto diferencial de Rapa en ratones con NPC de distintos backgrounds genéticos	11
Figura 8. Movimiento lisosomal/vacuolar de esteroides en células humanas y <i>S. cerevisiae</i> , respectivamente	13
Figura 9. Micrografía electrónica de una célula de <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 10. Árbol filogenético de unión de vecinos de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este estudio	16
Figura 11. Morfología de los fenotipos vacuolares A, B y C en células de <i>S. cerevisiae</i> .	18
Figura 12. Mapeo de QTL utilizando un panel de <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 13. U18 aumenta los niveles de filipina en <i>S. cerevisiae</i> de diversos backgrounds genéticos	23
Figura 14. Curvas de crecimiento de las cepas parentales bajo concentraciones crecientes de Rapa.....	24
Figura 15. Aumento de la disgregación vacuolar en cepas parentales tratadas con Rapa	25

Figura 16. Cuantificación de los fenotipos vacuolares A, B y C de las cepas parentales de <i>S. cerevisiae</i> bajo las condiciones Control y Rapa.....	26
Figura 17. Efecto diferencial sobre el crecimiento de las cepas parentales tratadas con U18 y la combinación Rapa-U18	27
Figura 18. Efecto de los tratamientos de U18 y Rapa-U18 sobre μ Máx en las diversas cepas de <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 19. Efecto diferencial de Rapa con respecto a U18.....	30
Figura 20. Efecto diferencial de Rapa con respecto a U18 sobre la disgregación vacuolar de las cepas parentales	31
Figura 21. Cuantificación de los fenotipos vacuolares A, B y C de las cepas parentales de <i>S. cerevisiae</i> bajo las condiciones U18 y Rapa-U18	32
Figura 22. Correlaciones entre los porcentajes de los fenotipos vacuolares A, B y C con los μ Máx por condición	34
Figura 23. Efecto de U18 con respecto a Rapa sobre los niveles de filipina en <i>S. cerevisiae</i> de diversos backgrounds genéticos	35
Figura 24. Valores de CTCF normalizados con respecto a los valores de CTCF del control para cada cepa parental	36
Figura 25. Variación fenotípica entre las segregantes de las cepas WE x WA frente a diversos tratamientos.....	38
Figura 26. Mapeo de QTL en función de la respuesta a Rapa	39
Figura 27. Mapeo de QTL en función de la respuesta a Rapa en relación a U18.....	40
Figura 28. Criterios de priorización de los genes cercanos al pico de ligamiento en respuesta de Rapa con respecto a U18.....	41
Tabla 1. Variantes no sinónimas en genes de <i>S. cerevisiae</i> que se correlacionan con el efecto de Rapa en relación con U18 en términos de μ Máx.....	42
Tabla 2. Variantes no sinónimas entre las cepas de ratón C57BL/6J y FVB/NJ de los genes ortólogos de <i>S. cerevisiae</i> seleccionados.....	43
Tabla 3. Variantes no sinónimas de los potenciales genes moduladores presentes en cada cepa parental	44
Figura 29. La disfunción de la autofagia en NPC	48
Figura 30. Vías celulares de autofagia que podrían verse afectadas por Rapa en NPC..	49
Figura 31. Modelo molecular de TORC2 en <i>S. cerevisiae</i>	53

Abreviaturas:

AC	Área celular
CTCF	Fluorescencia celular total corregida
CTD	Dominio luminal C-terminal
CTTNBP2	Proteína de unión a cortactina 2
DEPTOR	Proteína que contiene el dominio DEP
DI	Densidad integral
FAMLF	Fluorescencia por unidad de área media
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FDR	Tasa de falsos positivos menor de 0.05
FKBP12	Proteína de unión a FK506 de 12 kDa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LSD	Trastorno de almacenamiento lisosomal
MLD	Dominio luminal Medio
mTORC1	TORC1 en mamíferos
mTORC2	TORC2 en mamíferos
NA	Cepa parental de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> North American
NPC	Enfermedad de Niemann-Pick tipo C
NTD	Dominio luminal N-terminal
OD ₆₂₀	Densidad óptica a 620nm
PRAS40	Sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa
QTL	Locus de rasgos cuantitativo
Rapa	Rapamicina
RE	Retículo endoplasmático
SA	Cepa parental de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sake
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i>
SIFT	<i>Sorting intolerant from tolerant</i>
SNV	Polimorfismo de variante único
SSD	Dominio sensor de esterol

TEA	Trastorno del espectro autista Trastorno del espectro autista
TMD	Dominio transmembrana
TOR	Blanco de Rapamicina
TORC1	Complejo TOR 1
TORC2	Complejo TOR 2
U18	U18666A
V-ATPasas	ATPasas vacuolares
WA	Cepa parental de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>West African</i>
WE	Cepa parental de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Wine/European</i>

Resumen

La enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC) es un trastorno de almacenamiento lisosomal causado por mutaciones de pérdida de función en los genes *NPC1* y *NPC2*, que codifican proteínas lisosomales transportadoras de colesterol. El 95% de los pacientes presentan mutaciones en *NPC1*, mientras que el resto tiene mutaciones en *NPC2*. A nivel celular, las células NPC acumulan colesterol no esterificado y otros lípidos en los lisosomas. Los síntomas clínicos varían considerablemente entre pacientes, donde no hay una clara asociación entre fenotipo y genotipo. Rapamicina se ha investigado como terapia experimental para NPC, pero su eficacia es variable en modelos celulares humanos y murinos. Estudios en ratones *Npc1*^{-/-} con diferentes *backgrounds* genéticos presentan una respuesta *background* genético-dependiente a rapamicina, en un caso aumentando la supervivencia de los ratones, mientras que en otro *background* es tóxica. Estos resultados sugieren que existen variantes en genes moduladores de la respuesta a rapamicina. Con el fin de identificarlos, se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio, debido a que posee ortólogos funcionales de NPC1 (NCR1) y de los complejos blanco de rapamicina (TORC1 y TORC2). Se modeló la enfermedad en diferentes *backgrounds* genéticos de *S. cerevisiae* utilizando U18666A, un inhibidor de NCR1, y en combinación con rapamicina se evaluaron parámetros fisiológicos y celulares. Se identificó a 0,25 nM como la menor concentración de rapamicina que en combinación de U18666A tuvo un efecto diferencial en diversas cepas parentales, con respecto a $\mu\text{Máx}$, un parámetro fisiológico que representa la capacidad reproductiva y sobre la frecuencia de los fenotipos vacuolares de las cepas utilizadas. Estos efectos son congruentes con lo observado en modelos murinos. Se realizó un estudio de ligamiento genético utilizando el parámetro $\mu\text{Máx}$, para identificar potenciales genes moduladores de la respuesta a rapamicina. El análisis identificó un pico significativo en el cromosoma 13. Utilizando criterios de priorización, se encontraron 9 genes candidatos, donde destacan *AVO2* y *STV1*, que codifican para una subunidad de TORC2 y del dominio vacuolar ATPasa V0, respectivamente. Estos hallazgos representan un avance en el entendimiento de esta enfermedad. En un futuro, los genes identificados como posibles moduladores de la respuesta a rapamicina deben ser validados a través de estudios funcionales para avanzar hacia una medicina de precisión en NPC.

Abstract

Pharmacogenetic study in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of modulator genes of the response to Rapamycin in Niemann Pick type C disease.

Niemann-Pick type C (NPC) disease is a lysosomal storage disorder caused by loss of function mutations in the *NPC1* and *NPC2* genes, which encode lysosomal cholesterol transport proteins. 95% of patients have mutations in *NPC1*, while the remaining individuals have mutations in *NPC2*. At the cellular level, NPC cells accumulate unesterified cholesterol and other lipids in the lysosomes. Clinical symptoms vary considerably among patients, with no clear association between phenotype and genotype. Rapamycin has been investigated as an experimental therapy for NPC, but its effectiveness varies in human and murine cell models. Studies in *Npc1*^{-/-} mice with different genetic backgrounds show a genetic background-dependent response to rapamycin, in one case increasing mouse survival, while in another background it is toxic. These results suggest the presence of modulator genes influencing the response to rapamycin. To identify these genes, *Saccharomyces cerevisiae* yeast was used as a study model, due to its functional orthologs of NPC1 (NCR1) and target of rapamycin complexes (TORC1 and TORC2). The disease was modeled in different genetic backgrounds of *S. cerevisiae* using U18666A, an NCR1 inhibitor, and physiological and cellular parameters were evaluated in combination with rapamycin. A concentration of 0.25 nM of rapamycin was identified as the lowest concentration that had a differential effect on various parental strains in combination with U18666A, with respect to $\mu\text{Máx}$, a physiological parameter that represents reproductive capacity and on the frequency of vacuolar phenotypes of the strains used. These effects are consistent with those observed in murine models. A genetic linkage study using the $\mu\text{Máx}$ parameter was conducted to identify potential modulator genes of the response to rapamycin. The analysis identified a significant peak on chromosome 13. Using prioritization criteria, 9 candidate genes were found, with *AVO2* and *STV1* standing out, which encode a subunit of TORC2 and the vacuolar ATPase V0 domain, respectively. These findings represent progress in understanding this disease. In the future, the genes identified as potential modulators of the response to rapamycin should be validated through functional studies to advance towards precision medicine in NPC.

Introducción

Trastornos de almacenamiento lisosomal

Los trastornos de almacenamiento lisosomal (LSD, por su sigla en inglés; *Lysosomal Storage Disorder*) son causados por mutaciones en genes que codifican proteínas lisosomales, incluyendo, hidrolasas ácidas solubles, proteínas integrales de membrana, transportadores de lípidos e iones, moduladores de enzimas, activadores o bien proteínas no lisosomales que son cruciales para la función de este organelo (Platt et al., 2018). Estas mutaciones afectan el procesamiento y degradación de sustratos, lo que disminuye el transporte de lípidos y otros metabolitos, provocando la acumulación progresiva de macromoléculas no degradadas o parcialmente degradadas dentro de los lisosomas (Parenti et al., 2015; Platt et al., 2018). Existen más de 70 enfermedades en la familia de las LSDs (Platt et al., 2018).

Niemann Pick tipo C como LSD

La enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC) pertenece al grupo de las LSD. Se caracteriza por la acumulación de colesterol no esterificado derivado de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por su sigla en inglés; Low Density Lipoproteins), además de esfingomielina, glucosilceramida y esfingosina (Lloyd-Evans et al., 2008; te Vruchte et al., 2004). Esta acumulación intralisosomal conduce a una mala degradación de proteínas, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, alteraciones del citoesqueleto y muerte celular (Amritraj et al., 2013; Ba et al., 2017; Bu et al., 2002; Garvera et al., 2002; Höglinger et al., 2019; Klein et al., 2011).

Se estima que la enfermedad de NPC afecta a 1:100.000 nacidos vivos y los principales órganos afectados son el cerebro, el bazo, hígado y los pulmones (Vázquez et al., 2012). Se hereda de forma monogénica, con un patrón de herencia autosómica recesiva debido a mutaciones de pérdida de función en los genes *NPC1* y *NPC2* (Berger et al., 2005; Vázquez et al., 2012).

El 95% de los casos se deben a mutaciones en *NPC1* mientras que el 5% restantes en *NPC2* (Berger et al., 2005). El gen *NPC1* se encuentra en el cromosoma 18q11-q12, abarca 56 kb y contiene 25 exones (Gen ID: 4864), y *NPC2* está ubicado en el cromosoma 14q24.3, abarca 13,5 kb y tiene 5 exones (Gen ID: 10577). *NPC1* y *NPC2* codifican respectivamente para proteínas con los mismos nombres, las cuales participan en la salida de colesterol de los lisosomas (Ko et al., 1999; Ohgami et al., 2004).

NPC1 es una proteína lisosomal con 13 dominios transmembrana (TMD, por su sigla en inglés; *Transmembrane Domain*) que se localiza en la membrana lisosomal. Por otro lado, *NPC2* es una proteína lisosomal soluble que posee un dominio de unión a esteroides, el cual interactúa con colesterol y otros lípidos, para transferirlos a *NPC1*. *NPC1* posee subdominios orientados hacia el lumen (NTD; por su sigla en inglés; *N-terminal Luminal Domain*). Sus TMD forman un dominio de unión a esteroides (SSD, por su sigla en inglés; *Sterol Sensing Domain*), un dominio luminal medio (MLD, por su sigla en inglés; *Middle Luminal Domain*) que se une a *NPC2*, y el dominio C-terminal (CTD, por su sigla en inglés; *N-terminal Luminal Domain*) que interactúa con MLD para ayudar en la transferencia de colesterol y otros lípidos de *NPC2* a *NPC1* (Li et al., 2016; Lloyd-Evans et al., 2008; Winkler et al., 2022).

Ambas proteínas median la integración de esteroides en la membrana lisosomal, para su posterior redistribución a otras membranas celulares (Figura 1) (Infante et al., 2008; Winkler et al., 2022).

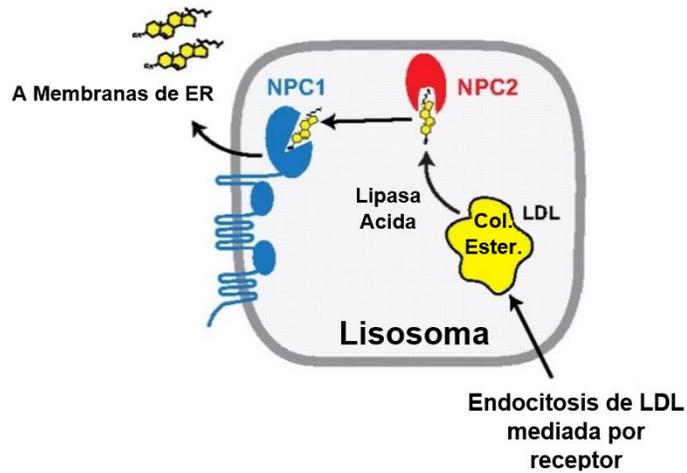


Figura 1. Modelo de transferencia de colesterol y esfingolípidos derivado de LDL a la membrana lisosomal mediada por NPC1 y NPC2. La lipasa ácida lisosomal cataboliza los esteres de colesterol (Col. Ester.) derivados de las LDL. Posteriormente, el colesterol libre se une a NPC2 y es transferido a NPC1. Esta última media la salida de colesterol, para ser redistribuido a otras membranas celulares, como el retículo endoplasmático (RE). Figura modificada de Infante y colaboradores (Infante et al., 2008).

Esta acumulación anormal de colesterol tiene distintos efectos sobre los lisosomas, tales como su agrandamiento y disgregación, esto tiene como efecto la disfunción de este organelo, lo cual puede ser detectado con la tinción con *lysotracker* (sonda fluorescente que se une a lisosomas) (Figura 2) (Cermak et al., 2016; Yañez et al., 2020; Zhitomirsky et al., 2018).

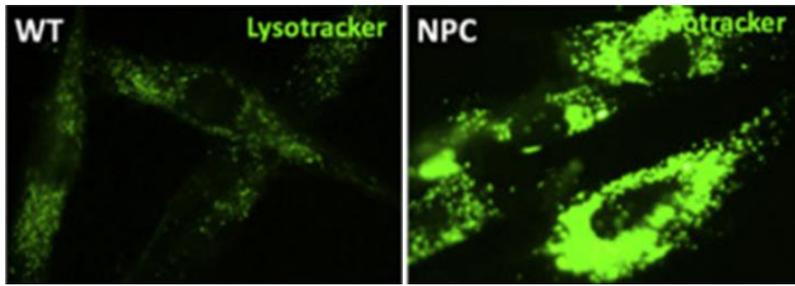


Figura 2. Incremento en la tinción con *Lysotracker* en fibroblastos NPC humanos. Las células NPC muestran un aumento en la intensidad de la marca con *Lysotracker* y los organelos positivos para esta tinción se distribuyen a lo largo de toda la célula, con la excepción del núcleo. Las células sanas (WT) muestran la tinción uniforme característica de los organelos ácidos (Yañez et al., 2020).

La enfermedad de NPC se caracteriza por una amplia variedad de síntomas viscerales, neurológicos y psiquiátricos, pueden presentarse de maneras muy diversas entre pacientes (Lee et al., 2016). Estos síntomas varían desde una forma neonatal de progresión rápida hasta una condición neurodegenerativa crónica de inicio en la edad adulta (Bianconi et al., 2019). Debido a esta variación, la esperanza de vida de los pacientes puede oscilar desde unos pocos días, hasta más de 60 años, aunque la mayoría de los pacientes sobrevive entre los 10 y los 25 años (Bianconi et al., 2019).

En las formas infantiles de la enfermedad (menores de 4 años), algunos pacientes desarrollan una disfunción hepática severa, en conjunto con complicaciones pulmonares, que pueden llevar a una muerte precoz (Klein et al., 2018; Mengel et al., 2017). En las formas juveniles de la enfermedad (entre 4 y 16 años), predominan los síntomas neurológicos; mientras que en las formas adultas (mayores de 16 años) predominan los síntomas psiquiátricos (Mengel et al., 2017). Aproximadamente el 50% de los pacientes padecen colestasis neonatal, ictericia y agrandamiento del hígado y/o bazo. De ellos, aproximadamente el 10% muere por insuficiencia hepática, antes de cumplir los 6 meses de edad (Klein et al., 2018). La Figura 3 detalla los síntomas de cada forma de NPC de acuerdo con la edad de aparición de los síntomas.

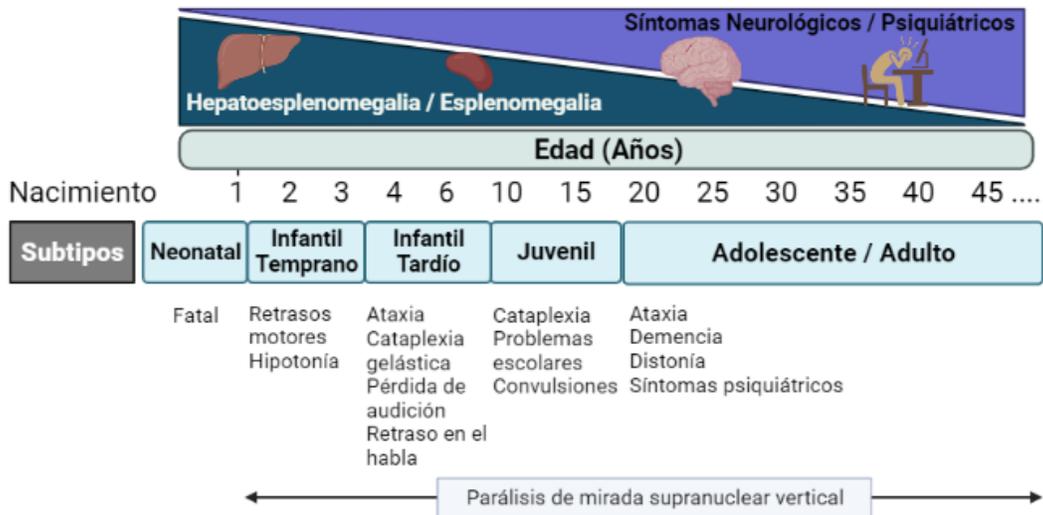


Figura 3. Variabilidad fenotípica en NPC. Las manifestaciones clínicas de NPC varían de acuerdo a la edad de aparición de los síntomas. De manera genérica, se agrupan en síntomas viscerales, neurológicos y psiquiátricos. Es importante destacar que existe variabilidad fenotípica dentro de cada subtipo. Figura modificada de Vanier y colaboradores (Vanier, 2010).

Se han identificado más de 250 mutaciones en *NPC1* y 20 en *NPC2*, las que podrían contribuir a la amplia variedad de síntomas y de progresiones que presentan los pacientes con NPC (Alavi et al., 2013; Garver et al., 2010). Sin embargo, las asociaciones entre genotipo y fenotipo son pobres o inexistentes (Mengel et al., 2017). Es más, se ha descrito el caso de hermanos con la misma mutación y variabilidad fenotípica (Lee et al., 2016; Maubert et al., 2015; Walterfang et al., 2009).

Los niveles de fluorescencia de *Lysotracker* en fibroblastos dérmicos han sido un parámetro que se correlaciona con la severidad de NPC (Figura 4), donde a mayor es su nivel, menor es la edad de inicio de los síntomas y por tanto existe una menor esperanza de vida (Baxter et al., 2022).

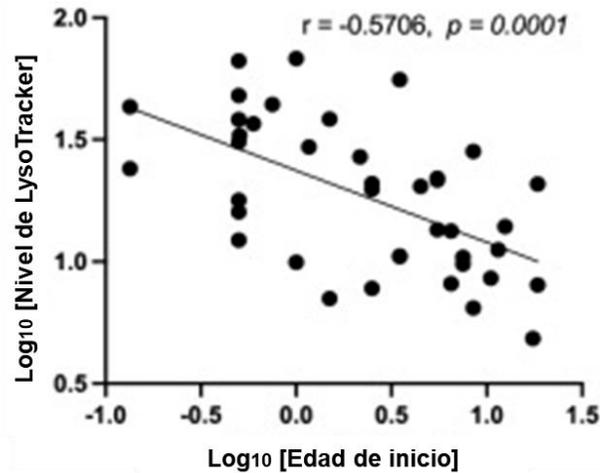


Figura 4. LysoTracker como biomarcador de la edad de inicio de los síntomas en NPC. Los niveles de *lysoTracker* se correlacionan inversamente con la edad de inicio de los síntomas de NPC y a su vez, se encuentra directamente relacionado con la severidad de la enfermedad (Baxter et al., 2022).

A pesar de la gran variabilidad de presentaciones clínicas, se han propuesto enfoques terapéuticos únicos. En este sentido, en este proyecto buscamos cambiar este paradigma, de manera que cada paciente o grupo de pacientes reciba intervenciones a medida, en función de su propia biología, lo que se conoce como la medicina de precisión y farmacogenómica (Kosorok & Laber, 2019).

Métodos de Diagnóstico de NPC

El diagnóstico de NPC se realiza mediante la combinación de estudios bioquímicos y genéticos. Se utiliza la medición de tres marcadores bioquímicos: oxisteroles (productos de oxidación del colesterol), lisoesfingomielina 509 y lisoesfingomielina. Estos marcadores se encuentran elevados en el plasma de pacientes con NPC, pero para confirmar el diagnóstico, se requiere de análisis genéticos y/o una prueba de filipina (sonda fluorescente que se une a esteroides libres) en fibroblastos dérmicos, lo que permite observar directamente la acumulación intracelular de colesterol no esterificado (Figura 5) (Geberhiwot et al., 2018; Klein et al., 2014).

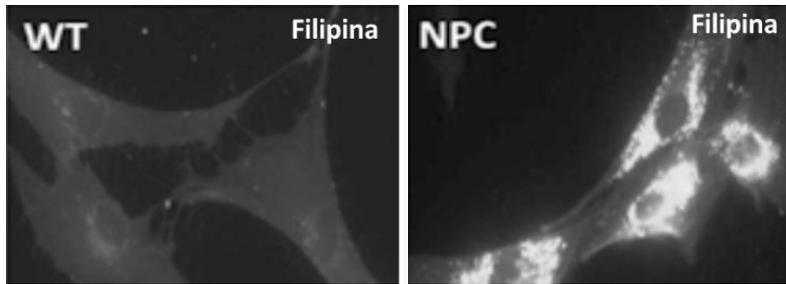


Figura 5. Tinción de Filipina como método de diagnóstico de NPC. Las células NPC muestran un aumento en la marca perinuclear de filipina, debido a los mayores niveles de colesterol en los lisosomas, con respecto a células sanas (WT) (Klein et al., 2014).

El papel central de la proteína TOR en la supervivencia celular

La proteína TOR (blanco de Rapamicina, por su sigla en inglés; *Target of Rapamycin*) es altamente conservada en la evolución y forma parte de diferentes complejos con un papel importante en la adaptación de las células a su entorno. Estos complejos integran señales extracelulares e intrínsecas para regular los procesos que controlan el crecimiento celular, mediante su actividad como quinasas (Tatebe & Shiozaki, 2017). Además, participan en la adaptación de las células a su entorno, al vincular señales extracelulares e intrínsecas a los principales procesos celulares que regulan su crecimiento (Yerlikaya et al., 2016).

Se ha descubierto que la proteína TOR está implicada en diversas patologías, tales como diabetes, trastornos neurodegenerativos, cáncer y obesidad (Tatebe & Shiozaki, 2017). Para el tratamiento de éstas, se ha utilizado rapamicina (Rapa), un inhibidor de la actividad de TOR (Loewith & Hall, 2011).

TOR se encuentra en dos complejos multiproteicos, funcional y estructuralmente distintos, denominados complejo TOR 1 (TORC1) y complejo TOR 2 (TORC2) (Hosios et al., 2022).

TORC1 en mamíferos (mTORC1), está compuesto por Raptor, proteína asociada a la regulación de mTOR, al igual que el sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa (PRAS40, por su sigla en inglés; *Proline-rich Akt Substrate Of 40 kDa*). Por otro lado, TORC2 en mamíferos (mTORC2), se encuentra compuesto por Rictor, que interactúa con mSin1 y con Protors 1 y 2 (Protor 1/2). Estas subunidades se encargan de regular la activación de su respectivo complejo, mediante la interacción entre ellas y otras proteínas blanco. Ambos complejos, comparten mTOR como subunidad catalítica, así como mLST8 y la proteína que

contiene el dominio DEP (DEPTOR, por su sigla en inglés; *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*), que están asociados con la degradación y activación de mTOR, como se muestra en la Figura 6 (Facchinetti et al., 2008; Luo et al., 2018).

mTORC1 integra señales de factores de crecimiento, oxígeno, niveles de energía y nutrientes, tal como aminoácidos, necesarios para estimular el crecimiento y la proliferación celular. Esto mediante la activación de procesos anabólicos, como la síntesis de proteínas, lípidos (ácidos grasos y esteroides) y nucleótidos, así como también la estimulación del metabolismo energético, promoviendo procesos como la glucólisis y glutaminólisis. Asimismo, inhibe procesos catabólicos como la autofagia (Figura 6) (Hosios et al., 2022; Luo et al., 2018).

Por otro lado, mTORC2 responde a factores de crecimiento y regula la organización del citoesqueleto y la supervivencia celular, a través de la inducción del metabolismo de lípidos y de la glucosa por vías independientes a mTORC1 (Figura 6) (Facchinetti et al., 2008; Luo et al., 2018).

Además, mTORC1 y mTORC2 difieren en su respuesta a Rapa. Este fármaco inhibe directamente mTORC1 a través de un mecanismo alostérico mediado por la proteína de unión a FK506 de 12 kDa (FKBP12, por su sigla en inglés; *FK506-Binding Protein 12*), que actúa como cofactor y posibilita la inhibición de mTORC1 (Jacinto et al., 2004; März et al., 2013). En cambio, mTORC2 solo responde a tratamientos crónicos con Rapa (Figura 6). Se ha propuesto que Rapa inhibe el ensamblaje de mTORC2, ya que requiere FKBP12, el cual es secuestrado por Rapa, aunque el mecanismo no se encuentra completamente dilucidado (Schreiber et al., 2015).

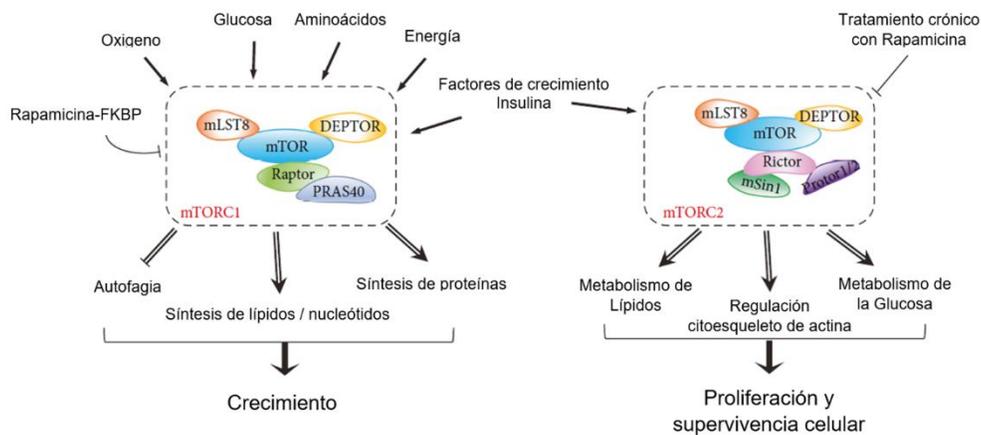


Figura 6. Principales componentes moleculares, señales detectadas y procesos regulados por mTORC1 y mTORC2. Los complejos mTORC1 y mTORC2 detectan señales extracelulares e intrínsecas. mTORC1 detecta niveles de oxígeno, glucosa, aminoácidos, energía y factores de crecimiento (insulina). Por otro lado, mTORC2 únicamente detecta factores de crecimiento (insulina). Estos complejos gatillan diversos procesos para regular el crecimiento, proliferación y supervivencia celular. mTORC1 inhibe la autofagia y regula la síntesis de lípidos, nucleótidos y proteínas. mTORC2 regula el citoesqueleto de actina y el metabolismo de lípidos y glucosa. En cuanto a las condiciones de inhibición por parte de Rapa, mTORC1 es inhibido directamente por el complejo Rapa-FKBP, mientras que mTORC2 es inhibido por el tratamiento crónico con Rapa, por un mecanismo no dilucidado. Figura modificada de Luo y colaboradores (Luo et al., 2018).

Resultados contradictorios en el uso de Rapa como tratamiento de NPC

Rapa es un fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su sigla en inglés; *Food and Drug Administration*). Esta droga además de activar la autofagia posee propiedades inmunosupresoras (Kuo et al., 1992).

Diversos estudios han explorado el efecto terapéutico de Rapa en la enfermedad de NPC. Uno de ellos examinó su efecto sobre los niveles de colesterol en fibroblastos dérmicos humanos derivados de pacientes NPC. La inducción de la autofagia con Rapa aumentó la acumulación de colesterol, lo que sugiere que la inhibición de la autofagia es una alternativa terapéutica para la enfermedad (Elrick et al., 2012). Sin embargo, en otro estudio evaluó el efecto de Rapa en la apoptosis en cultivos neuronales derivados de células madre pluripotentes inducidas de pacientes con NPC. Al tratar estas células con Rapa, éstas incrementaron su viabilidad, por lo tanto, contrario al caso anterior, se sugiere que la

estimulación de la autofagia con Rapa puede ser una estrategia terapéutica para NPC (Maetzel et al., 2014).

Finalmente, estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando modelos murinos de la enfermedad de NPC en los *backgrounds* FVB y C57BL/6J han demostrado una gran variabilidad en la respuesta a Rapa. A pesar de que los ratones comparten la misma mutación en *Npc1*, Rapa ejerce efectos opuestos que son *background* genético-dependiente con respecto a su condición *Mock*, control donde solo es administrado el disolvente utilizado y observar el efecto neto de la droga, en este caso para Rapa su disolvente fue dimetilsulfóxido. Los ratones NPC-C57BL6/J tratados con Rapa logran duplicar su supervivencia, alcanzando aproximadamente 60 días en comparación a los tratados con *Mock* donde sobreviven cerca de 30 días. En cambio, para los ratones NPC-FVB, Rapa es tóxica, por lo que mueren antes, sobreviviendo alrededor de 65 días en comparación a su *Mock* los cuales sobreviven aproximadamente 80 días (Figura 7) (Calderón & Klein, 2018).

Estos resultados contradictorios sugieren la existencia de variantes genéticas presentes en genes moduladores de la respuesta a Rapa. Estos corresponden a locus capaces de alterar el fenotipo normalmente asociados a otros locus, los que pueden estar alejados entre sí, puede deberse a interacciones directas al proceso biológico alterado y/o su compensación funcional a través de vías alternativas (Hamilton & Yu, 2012; Rahit & Tarailo-Graovac, 2020; Riordan & Nadeau, 2017).

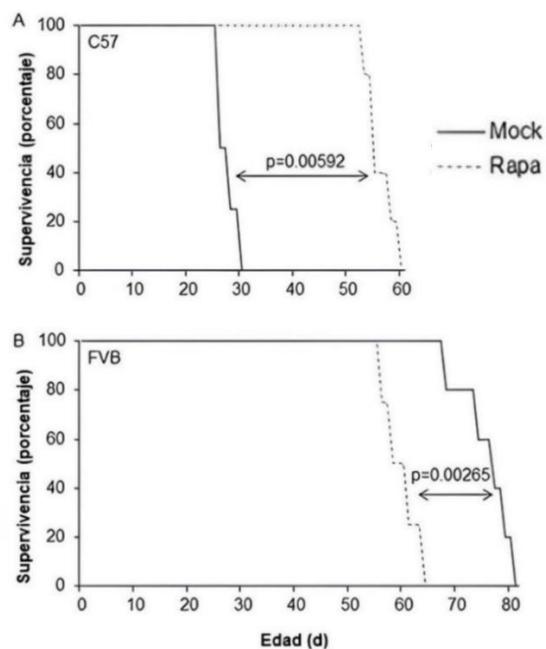


Figura 7. Efecto diferencial de Rapa en ratones con NPC de distintos *backgrounds* genéticos. Curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier en días (d), de ratones *Npc1^{-/-}*, en los *backgrounds* C57BL6/J (C57) (A) y FVB/J (B), inyectados con *Mock* (líneas continuas) o Rapamicina (Rapa; 10 mg/kg) (líneas discontinuas). Las diferencias significativas entre las curvas de supervivencia se determinaron mediante análisis de Log-rank (Mantel-Cox). Los valores se consideraron significativamente diferentes cuando $p \leq 0,05$ (Calderón & Klein, 2018).

La droga U18666A en el modelamiento de NPC

La droga lisotrópica U18666A (U18), corresponde a una amina anfipática que inhibe la actividad transportadora de lípidos de NPC1, convirtiéndola en una herramienta farmacológica versátil y ampliamente utilizada para modelar NPC (Higgins et al., 1999; Karten et al., 2003; Pacheco et al., 2007). Esta droga actúa mediante su unión directa a SSD de NPC1 (Lu et al., 2015). Desde los años 80, esta droga ha sido utilizada en modelos murinos para el estudio de cataratas, debido a que el colesterol es el mayor componente lipídico del cristalino (Cenedella, 1983; Rintoul et al., 1987).

Además, se ha utilizado ampliamente para modelar NPC en modelos celulares, incluso en estudios farmacológicos, tales como, en modelos de fibroblastos, cultivos neuronales, entre otros (Amritraj et al., 2013; Contreras et al., 2016; Roff et al., 1991; Wheeler et al., 2019).

***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de NPC**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es un poderoso modelo de estudio, debido a su genoma simple y una gama de herramientas genéticas que se le pueden aplicar con mayor rapidez y facilidad con respecto a otros modelos más complejos, tales como el mapeo genético por ligamiento (Cervelli & Galli, 2021). Además, ya ha contribuido al entendimiento de patologías humanas, como diferentes tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y desordenes mitocondriales (Krobitsch & Lindquist, 1999; Pearce & Sherman, 1998; Stirling et al., 2011).

Es un modelo validado para el estudio de NPC, dado que posee ortólogos con las proteínas humanas NPC1 (NCR1) y NPC2. La proteína NCR1 presenta una identidad de secuencia del 33% con la proteína humana y conserva la mayor parte de los residuos asociados con su papel funcional en las regiones correspondientes (Berger et al., 2005; Zhang et al., 2004). NPC1 y NCR1 son ortólogos funcionales e intercambiables (Tsuji et al., 2017; Winkler et al., 2019). Es posible rescatar el fenotipo de *S. cerevisiae* Δ NCR1 con NPC1 (Berger et al., 2005), así como el fenotipo de células de mamíferos Δ NPC1 con NCR1 (Malathi et al., 2004; Winkler et al., 2019), lo que muestra que su función se encuentra conservada a lo largo de la evolución (Figura 8) (Cruz et al., 2000; Higalri et al., 2001; Winkler et al., 2019).

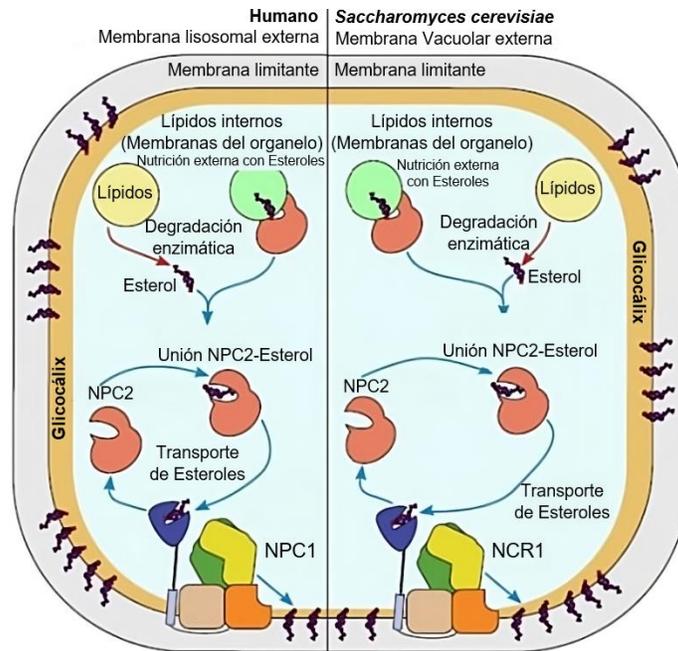


Figura 8. Movimiento lisosomal/vacuolar de esteroides en células humanas y *S. cerevisiae*, respectivamente. Las flechas indican el movimiento de esteroides en humanos (izquierda) y en *S. cerevisiae* (derecha). La integración de los esteroides a la membrana de los organelos ácidos (lisosomas en humanos y vacuolas en *S. cerevisiae*) se lleva a cabo en el lumen mediante el sistema NPC. Los esteroides son captados por el dominio de unión a esteroides de NPC2 y transportados hacia el dominio luminal medio de NPC1 o NCR1, según sea el modelo, incorporándolos a su membrana desde donde se pueden redistribuir a otras mediante transporte vesicular, no vesicular, o a través de sitios de contacto entre membranas. Figura modificada de Winkler y colaboradores (Winkler et al., 2022).

Por otra parte, el tratamiento de *S. cerevisiae* con U18 resulta en la acumulación de ergosterol, el equivalente del colesterol en levaduras, a través de su interacción con NCR1, reproduciendo un fenotipo similar a NPC en mamíferos (Höglinger et al., 2019; Long et al., 2019; Lu et al., 2015; Proszynski et al., 2005). Además, *S. cerevisiae* posee grandes vacuolas (Figura 9), que corresponden al símil del lisosoma humano, debido a que cumple sus mismas funciones, lo que facilita su estudio en un contexto de LSD (Frankl et al., 2015; Li & Kane, 2009).

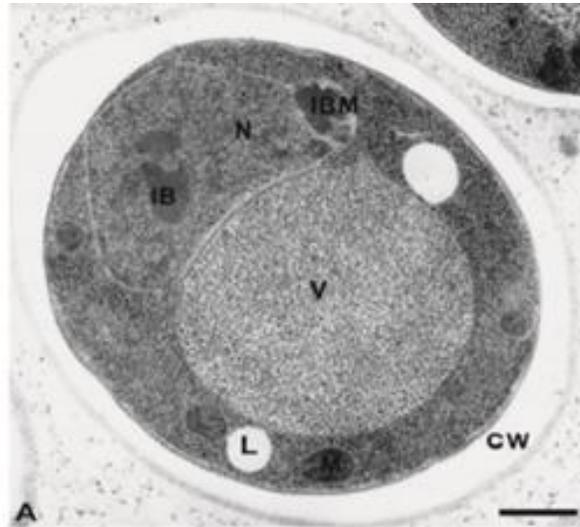


Figura 9. Micrografía electrónica de una célula de *S. cerevisiae*. La vacuola (V) ocupa un gran volumen celular. CW: pared celular; N: núcleo; IB: Cuerpos de inclusión; IBM: Cuerpos de inclusión con membrana; L: gotitas de lípidos. Barra de escala 0,5 µm (Frankl et al., 2015).

Adicionalmente, los complejos TORC1 y TORC2, y los procesos regulados por éstos, se encuentran conservados entre *S. cerevisiae* y mamíferos (Powers, 2007; Tatebe & Shiozaki, 2017), razón por la cual este modelo ha desempeñado un papel destacado tanto en el descubrimiento de TOR como en la elucidación de su función y el estudio de los efectos de Rapa (Brown et al., 1994; Sabatini et al., 1994). Así, es posible que en diferentes *backgrounds* genéticos de *S. cerevisiae* con fenotipo similar a NPC, se pueda encontrar un efecto diferencial del tratamiento con Rapa, tal como en modelos murinos (Figura 7). En *S. cerevisiae* se puede realizar análisis de mapeo genético (Storey et al., 2005), el cual es facilitado por la existencia de segregantes de diferentes cruces entre cepas que se encuentran genotipificadas, lo que permite realizar estudios de ligamiento para la identificación de genes moduladores en un tiempo menor en comparación a otros modelos (Cubillos et al., 2011, 2017).

En esta memoria buscamos identificar genes moduladores del efecto de Rapa en un contexto de NPC. Se tomaron como referencia resultados previos publicados donde se demostró que dos cepas de ratones con NPC mostraron una respuesta diferencial a Rapa (Figura 7) con el fin de replicarlos en *S. cerevisiae*. Para estudiar el efecto contradictorio de la molécula y potencialmente descubrir combinaciones de genes moduladores de esta respuesta a través de análisis de ligamiento genético.

Hipótesis

Existe un efecto diferencial del tratamiento con Rapa sobre fenotipos vacuolares y parámetros de crecimiento en diferentes cepas parentales de *S. cerevisiae* con fenotipo similar a NPC, el cual está determinado por uno o más genes moduladores.

Objetivo General

Caracterizar el efecto de Rapa sobre fenotipos vacuolares y parámetros de crecimiento celular e identificar los genes que podrían modificar estos efectos en *S. cerevisiae* con fenotipo tipo NPC de distintos *backgrounds* genéticos.

Objetivos Específicos

- 1.- Determinar la concentración mínima de Rapa donde cepas parentales de *S. cerevisiae* tratadas con U18 poseen un efecto diferencial sobre parámetros de crecimiento.
- 2.- Evaluar los fenotipos vacuolares de cepas parentales de *S. cerevisiae* tratadas y no tratadas con U18 y/o Rapa.
- 3.- Identificar genes moduladores de la respuesta del tratamiento con Rapa en cepas parentales de *S. cerevisiae* tratadas con U18.

Metodología

Cepas parentales de *S. cerevisiae*

Se utilizaron las cepas parentales haploides de *S. cerevisiae* aisladas de diferentes nichos ecológicos y ubicaciones geográficas, de distintos *backgrounds* genéticos: Y12 (llamada *Sake*, “SA”), YPS128 (llamada *North American*, “NA”), DBVPG6044 (llamado *West African*, “WA”) y DBVPG6765 (llamada *Wine/European*, “WE”), pertenecientes al panel de *S. cerevisiae* SGRP-4X. Estas cepas poseen divergencia genética (Figura 10). Adicionalmente, se utilizaron versiones haploides estables (ho::HygMX, ura3::KanMX), derivadas de cepas parentales de tipo silvestre (Cubillos et al., 2009).

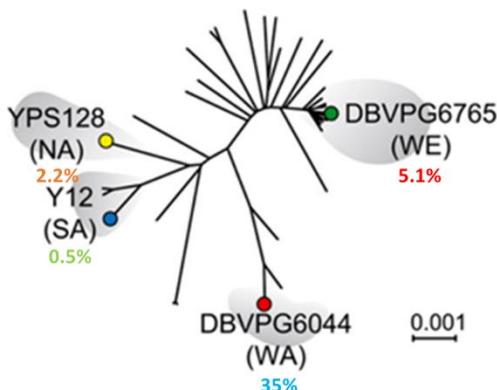


Figura 10. Árbol filogenético de unión de vecinos de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio. Las cepas WA, SA, NA y WE muestran diferentes grados de divergencia genética, basados en sus secuencias genómicas. (Cubillos et al., 2013; Liti et al., 2009; Warringer et al., 2011).

Se utilizaron *S. cerevisiae* recombinantes generadas previamente por el Dr. Francisco Cubillos, a través de cruces entre cepas haploides con tipos de apareamiento opuestos (Mat a y Mat a), en medio agar con extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPDA) (Cubillos et al., 2009).

Además, se utilizó un panel de *S. cerevisiae* que consta de 96 cepas segregantes del cruce entre las cepas WA y WE (WA x WE). Éstas se encuentran genotipificadas por

polimorfismos de variante único (SNV, por su sigla en inglés; *Single Nucleotide Polymorphisms*) con 171 marcadores, ubicados cada 70 kb aproximadamente. El genotificado cubre el 88,9% del genoma utilizando la cepa S288c como referencia. Las únicas regiones del genoma que presentan una baja cobertura son las subteloméricas dado que contienen zonas de ADN repetitivas (Cubillos et al., 2011).

Obtención de Curvas de Crecimiento

Tanto las cepas parentales como las segregantes, se precultivaron en 200 μ l de medio de cultivo mínimo para el crecimiento de levaduras (YNB), durante 48 horas a 28°C, sin agitación. Posteriormente, las cepas se inocularon en 200 μ l de YNB y se incubaron a 28°C durante 48 horas sin agitación en un lector de microplacas Tecan Sunrise, donde la densidad óptica fue medida cada 30 minutos a 620 nm (OD_{620}). Cada experimento se realizó en triplicado.

A partir de las curvas de crecimiento, se determinaron diversos parámetros utilizando el *software GrowthRates*. Estos parámetros incluyen $\mu_{M\acute{a}x}$, que es la tasa de crecimiento máxima específica y representa la capacidad reproductiva de las células (pendiente de la recta en la fase exponencial de crecimiento); $OD_{M\acute{a}x}$ (OD_{620} máximo alcanzado), lo que indica el nivel máximo de saturación durante la fase estacionaria; y Lag Time, que es el tiempo inicial necesario para que las células se adapten al medio y entren en la fase exponencial (Hall et al., 2014).

Para evaluar el efecto de U18 y/o Rapa sobre el crecimiento de las cepas, se obtuvieron curvas de crecimiento tanto en ausencia como en presencia de U18 a 200 μ g/ml disuelto en etanol 70%, condición previamente estandarizada en nuestro laboratorio. Esta fue la menor concentración de U18 en que se observaron efectos diferenciales significativos entre las cepas parentales. Asimismo, se evaluó el efecto de Rapa a diferentes concentraciones, disueltas en etanol / tween-20 (90% / 10%), así como sus combinaciones con U18. Además, se incluyó una condición control donde las cepas fueron tratadas con el equivalente de los disolventes de cada droga utilizada (condición *Mock*).

Marcación con FM4-64 y Microscopía Confocal

Las cepas parentales se cultivaron en medio rico para el crecimiento de levaduras (YPD), conteniendo U18 y/o Rapa y como control, solo YPD; las que se incubaron con FM4-64 (sonda lipofílica específica para membranas vacuolares, excitación y emisión a 515-640 nm) a 3 μ M (Seeley et al., 2002; Suzuki et al., 2012), esta sonda nos entrega información equivalente a la entregada por *lysotracker* ya que permite visualizar las vacuolas presentes en las células y determinar su grado de disgregación (dado por el número de vacuolas por célula). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 28°C por 24 horas.

Los fenotipos vacuolares A, B y C fueron evaluados mediante microscopía confocal, siguiendo los criterios definidos por Seeley y colaboradores (Figura 11). El fenotipo A con la menor disgregación vacuolar, predominante en condiciones normales, se define para células que poseen hasta 2 vacuolas. Las células con fenotipo B poseen 3 o más vacuolas claramente identificables. Las células con fenotipo C poseen vacuolas disgregadas que son difícil de cuantificar en términos de números. Este es el fenotipo predominante en células NPC o tratadas con U18. Para la cuantificación de cada fenotipo en las micrografías se utilizó el *software ImageJ*.

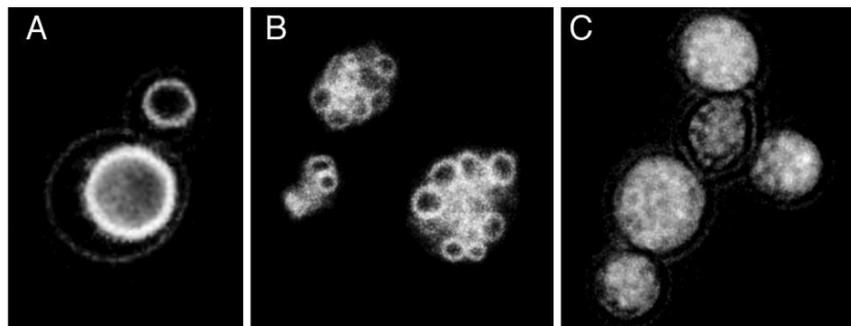


Figura 11. Morfología de los fenotipos vacuolares A, B y C en células de *S. cerevisiae*. Las células con fenotipo vacuolar A se caracterizan por tener 1 o 2 vacuolas en su citoplasma. Las células con fenotipo B tienen 3 o más vacuolas. Las células con fenotipo C se dificulta la determinación del número de vacuolas, debido a una alta disgregación de éstas (Seeley et al., 2002).

Tinción de Filipina y Microscopía de Fluorescencia

Para evaluar la acumulación de ergosterol se cultivaron las cepas parentales en medio YPD, en presencia de U18 y/o Rapa, además de YPD sin drogas como control. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 28°C por 24 horas. Posteriormente, cada cultivo fue incubado por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con filipina (sonda fluorescente que se une a ergosterol, excitación a 340-380 nm y emisión a 385-470 nm) a 2,14 mM. El presente protocolo fue adaptado a partir del utilizado por Brett y colaboradores (Brett et al., 2011).

La intensidad de fluorescencia fue representada por la fluorescencia celular total corregida (CTCF, por su sigla en inglés; *Corrected Total Cell Fluorescence*). CTCF se cuantificó utilizando el *software ImageJ*, que proporcionó los parámetros necesarios para determinarla a partir de las micrografías obtenidas, por lo que la fluorescencia fue determinada indirectamente. En cada micrografía, se midieron todas las células y áreas sin éstas para posterior corrección de la fluorescencia por célula.

De las lecturas fue obtenida la densidad integral (DI), la cual representa la intensidad de fluorescencia celular sin corregir, el área celular (AC) y la fluorescencia por unidad de área media (FAMLF), la que corresponde al promedio de las mediciones obtenidas por cada lectura de fondo en cada micrografía. Estos parámetros son importantes para la obtención de CTCF, la que fue determinada con la siguiente fórmula:

$$\text{CTCF} = \text{DI} - (\text{AC} \times \text{FAMLF})$$

CTCF permite una mejor comparación de los niveles de ergosterol en cada caso de estudio, gracias a la corrección de la intensidad de fluorescencia neta obtenida.

Mapeo cuantitativo de locus de rasgos a través de ligamiento genético

Los mapeos de rasgos cuantitativos de locus (QTL, por su sigla en inglés; *Quantitative Trait Loci*), fueron realizados en función de los siguientes fenotipos: los valores de $\mu\text{Máx}$ de la condición Rapa y la combinación de Rapa con U18, normalizados por los $\mu\text{Máx}$ de la condición *Mock* y U18, respectivamente, obtenidos de las curvas de crecimiento de las 96 segregantes del cruce WA x WE, proceso mostrado en la Figura 12.

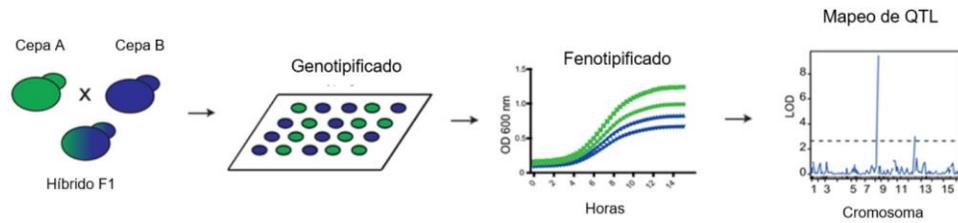


Figura 12. Mapeo de QTL utilizando un panel de *S. cerevisiae*. Dos cepas parentales con fenotipos divergentes es A (verde) y B (azul), son seleccionadas para cruzarse y generar un híbrido F1. La esporulación de este híbrido se origina en una población recombinante, en la que se puede fenotipificar varios rasgos, como curvas de crecimiento y utilizarse para generar un mapeo de QTL a través de herramientas bioinformáticas. En el caso de esta memoria, se utilizó un panel de segregantes que ya se encuentra secuenciado. Figura modificada de Thompson y Cubillos (Thompson & Cubillos, 2017).

El mapeo se llevó a cabo con el *software R/qtl* (Cubillos et al., 2011). Se calcularon las puntuaciones de LOD utilizando un modelo no paramétrico y la significancia de cada región se determinó a partir de permutaciones. Para ello los valores del fenotipo se permutaron 1000 veces y se registró la puntuación máxima de LOD. Cada QTL se considera significativo si su puntuación LOD es mayor de 0,05. El porcentaje de varianza fenotípica para un QTL fue calculado con la siguiente fórmula, donde n representa el tamaño de la muestra:

$$\text{Porcentaje de varianza fenotípica} = 100 (1 - [10]^{((-2\text{LOD})/n)})$$

Análisis y selección de potenciales genes moduladores de la respuesta a Rapa

Se identificaron los genes ubicados 40 kb río arriba y río abajo de los picos significativos de mapeo de QTL, utilizando los datos de *www.ensembl.org*. Se priorizaron aquellos con ortólogos humanos utilizando la *Saccharomyces Genome Database*. Los potenciales efectos de las variantes en cada gen de las cepas parentales WA, SA, NA y WE se determinaron mediante el *software SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* con respecto al genoma de referencia de *S. cerevisiae* S288c. Esto permitió comparar las variantes presentes en cada cepa y determinar su posible relación con el fenotipo estudiado (Ng & Henikoff, 2001).

Posteriormente, se seleccionaron los genes cuyos ortólogos de ratón presentaban variantes no sinónimas entre las cepas C57BL6/J y FVB/NJ, dado que son las cepas donde se detectó la respuesta diferencial a Rapa en NPC con anterioridad (Figura 7). De esta manera se aumenta la probabilidad de que los genes identificados puedan modular esta respuesta. Para ello, estas variantes fueron determinadas con el *software* SIFT y en *Mouse Phenome Database* con la herramienta *GenomeMUSter Search* (Grubb et al., 2004). Esto permitió relacionar las variantes identificadas, para comparar sus efectos en cada modelo y facilitar su escalamiento a pacientes humanos. Cabe destacar que, entre ratones y humanos, sus ortólogos poseen un alto porcentaje de identidad, en comparación con *S. cerevisiae*.

Análisis Estadísticos

En este estudio se analizaron variables dependientes e independientes categóricas y cuantitativas. Las variables dependientes fueron: porcentajes de fenotipo vacuolar (cualitativa nominal), μ Máx (cuantitativa continua). Mientras las variables independientes fueron: cepas de *S. cerevisiae* (cualitativa nominal), U18 y Rapa (cualitativa dicotómica). Se realizó una estadística de centralización y dispersión para las variables continuas a través del *software Microsoft Excel*, mientras que para las variables cualitativas una estadística de frecuencia. La realización de las distintas pruebas estadísticas y cálculo de valor p de significancia estadística fue realizado con el *software GraphPad Prism 9.1.1*.

Se seleccionaron pruebas estadísticas en función de la naturaleza de las variables analizadas, así como el número de datos obtenidos y si cumplían con el supuesto de distribución normal, determinada mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), utilizando el *software SPSS IBM*. Los resultados donde se determinó la significancia fueron parámetros obtenidos a partir de μ Máx, CTCF y porcentajes de los fenotipos vacuolares. Con el fin de comparar los efectos entre los tratamientos estudiados en las cepas parentales, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (para datos sin distribución normal) o ANOVA de una vía (para datos con distribución normal) seguida de una prueba de Dunnett. Para comparar el efecto de un determinado tratamiento entre las cepas parentales, se utilizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

Finalmente, se realizaron correlaciones entre los porcentajes de los fenotipos vacuolares y del parámetro μ Máx, para cada cepa parental y condición estudiada. Se determinó el

coeficiente de correlación de Spearman (r) y el valor de p de correlación utilizando el software *GraphPad Prism 9.1.1*. Los detalles de cada prueba estadística se especifican en la leyenda que acompaña cada figura donde fueron aplicadas.

Resultados

Rapa ejerce una respuesta diferencial en cepas parentales de *S. cerevisiae* tratadas con U18.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que 200 µg/ml de U18 tiene un efecto diferencial en términos de µMáx entre las cepas parentales WA, SA, NA y WE de *S. cerevisiae* (resultados no publicados). Donde, las cepas WA y SA son resistentes, no experimentando cambios significativos en sus µMáx, mientras que las cepas NA y WE mostraron susceptibilidad, experimentando una disminución significativa en sus µMáx.

Para validar este modelo de *S. cerevisiae* para el estudio de NPC, se realizó tinción con filipina, una sonda fluorescente que se une al ergosterol, utilizada para diagnosticar NPC en humanos. Se observó que todas las cepas tratadas con U18 presentaron el fenotipo característico de NPC, que corresponde a la acumulación intracelular de ergosterol (Figura 13).

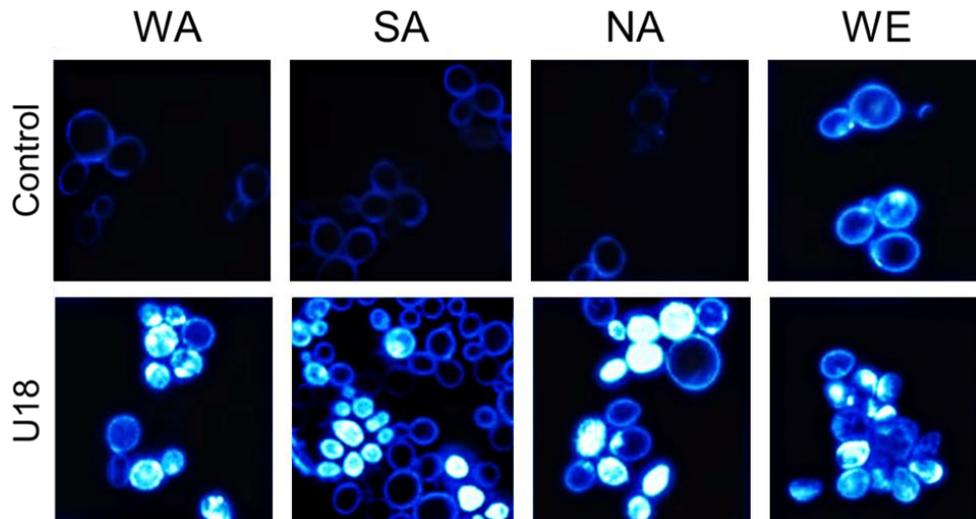


Figura 13. U18 aumenta los niveles de filipina en *S. cerevisiae* de diversos backgrounds genéticos. Imágenes representativas de las cepas parentales WA, SA, NA y WE en condiciones Control y U18666A (U18; 200 $\mu\text{g/ml}$), por 24 horas. En la condición Control, se observa marca de filipina en la membrana celular. En las células tratadas con U18 se observa marca fluorescente tanto en la membrana celular como intracelularmente, dado que esta droga inhibe el transporte de esteroides en las vacuolas, induciendo su acumulación en este organelo. En algunas células la tinción es uniforme, mientras que en otras se encuentra heterogéneamente distribuida, tal como ha sido descrito previamente en el modelo genético de $\Delta ncr1$ en *S. cerevisiae* (Brett et al., 2011). Microscopía UV visible 100X, velocidad de adquisición 600 ms.

Los niveles de ergosterol presentes serán retomados más adelante, donde es mencionada la intensidad de fluorescencia de filipina, para cada cepa parental bajo todas las condiciones de estudio.

El presente trabajo comenzó con la obtención de curvas de crecimiento de las cepas parentales WA, SA, NA y WE, bajo diferentes condiciones. Se determinó el parámetro $\mu_{\text{Máx}}$, que representa la capacidad reproductiva de las células y es un indicador útil para cuantificar el efecto de cada condición de estudio (Cubillos et al., 2009).

Se realizó un barrido de concentraciones de Rapa para determinar la concentración mínima de esta droga que no generase cambios en los $\mu_{\text{Máx}}$ de las cepas parentales determinados en la condición *Mock*, pero sí en las células con fenotipo NPC. Las concentraciones testeadas fueron: 0,25 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM y 200 nM (Figura 14).

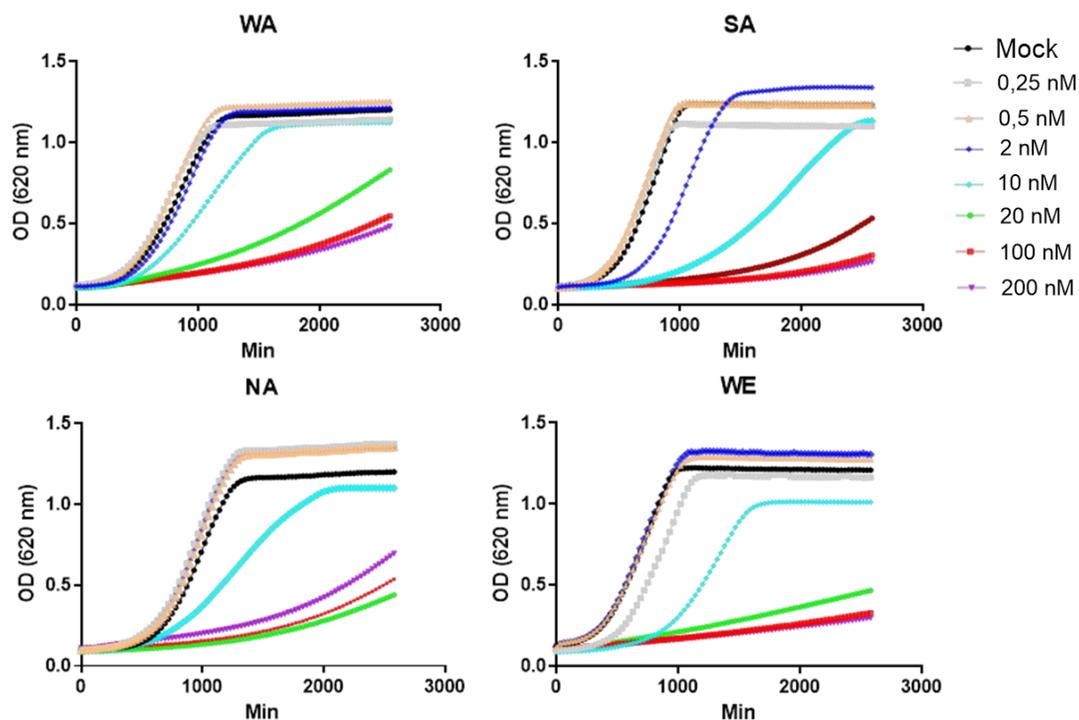


Figura 14. Curvas de crecimiento de las cepas parentales bajo concentraciones crecientes de Rapa. Las cepas parentales WA, SA, NA y WE, fueron tratadas con *Mock* y concentraciones crecientes de Rapamicina (Rapa; 0,25, 0,5, 2, 10, 20, 100 y 200 nM). A menor concentración de Rapa, menor es el efecto sobre las curvas de crecimiento con respecto a *Mock* y la concentración de 0,25 nM no genera un efecto sobre las curvas de crecimiento de las cepas parentales. Los gráficos de OD (620 nm) contra el tiempo en minutos (Min) fueron obtenidos utilizando el *Software GraphPad Prism 9.1.1*. Para las concentraciones de 0,5, 2, 10, 20, 100 y 200 nM n=2 y para 0,25 nM n=7.

Se observó que Rapa a 0,25 nM no mostró efectos en los parámetros de crecimiento con respecto a *Mock* (Figura 11), por lo tanto, no generan toxicidad en las células. Como control positivo, para confirmar que Rapa a esta concentración efectivamente gatilla los efectos biológicos descritos, tales como la activación de autofagia, se estudiaron los fenotipos vacuolares, dado que durante la autofagia se producen organelos con doble membrana que pueden ser detectados con la sonda FM4-64. Se observaron los efectos de cada condición en micrografías obtenidas de microscopio confocal, como se puede apreciar en los ejemplos mostrados en la Figura 15.

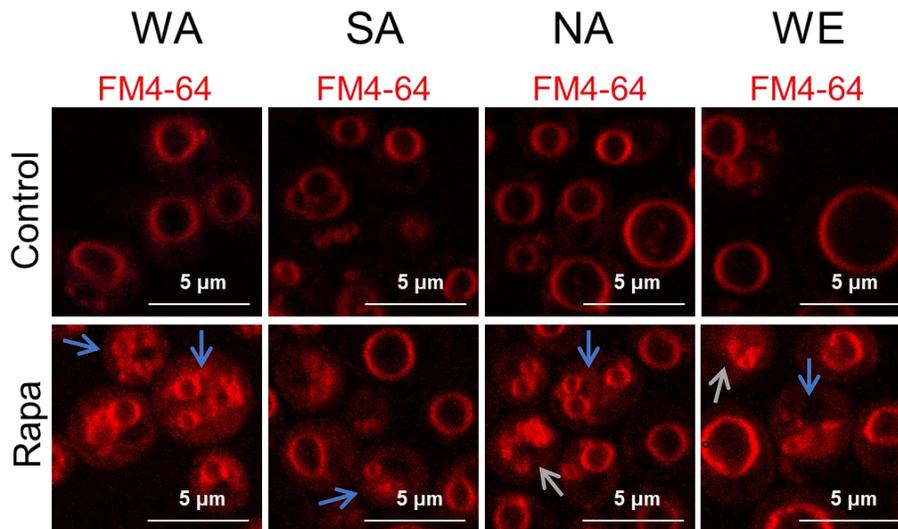


Figura 15. Aumento de la disgregación vacuolar en cepas parentales tratadas con Rapa. Imágenes representativas de las cepas parentales WA, SA, NA y WE bajo las condiciones Control y Rapamicina (Rapa; 0,25 nM), por 24 horas. Las vacuolas fueron marcadas con FM4-64, lo que permitió diferenciar los fenotipos vacuolares de interés. Pueden observarse más células con los fenotipos B y C, las que fueron indicadas por flechas azules y grises, respectivamente, siendo las más representativas de cada fenotipo en particular. Se evidencia una mayor disgregación vacuolar en la condición Rapa, comparado con la condición control, dado por un aumento del número de vacuolas por célula. Microscopía confocal 63X, zoom óptico 5X. Barra de escala 5 µm.

Las micrografías obtenidas (Figura 15) muestran cambios de la disgregación vacuolar de las cepas tratadas con Rapa, en comparación con el Control, donde se notó un aumento de éste para todas las cepas, este efecto es mejor apreciado a través de la cuantificación de los fenotipos vacuolares en cada condición (Figura 16).

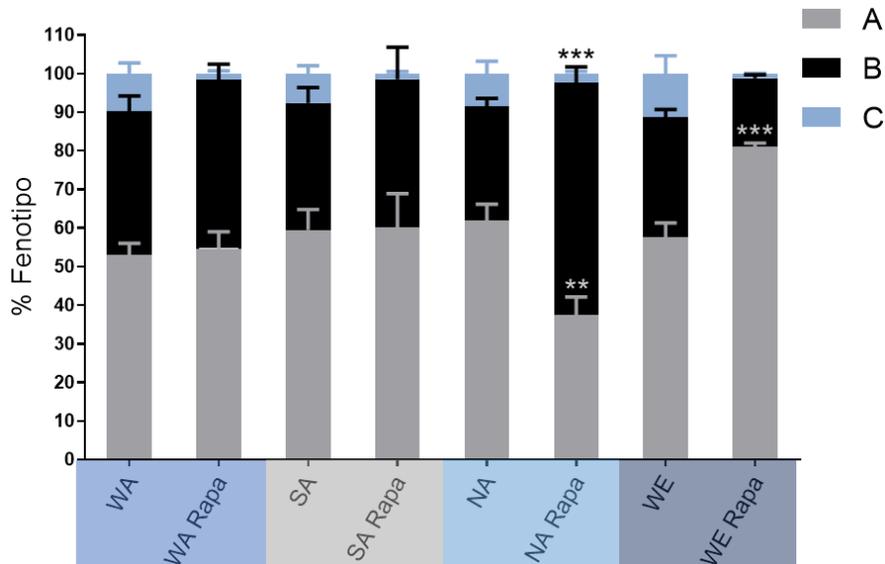


Figura 16. Cuantificación de los fenotipos vacuolares A, B y C de las cepas parentales de *S. cerevisiae* bajo las condiciones Control y Rapa. Los porcentajes de los fenotipos vacuolares A (gris), B (negro) y C (celeste), de las cepas parentales WA, SA, NA y WE, bajo las condiciones Control y Rapamicina (Rapa; 0,25 nM), por 24 horas, están expresados como promedios y las líneas superiores corresponden a sus errores estándar. Las células con fenotipo vacuolar A se caracterizan por tener 1 o 2 vacuolas en su citoplasma. Las células con fenotipo B tienen 3 o más vacuolas. En las células con fenotipo C se dificulta la determinación del número de vacuolas, debido a una alta disgregación de éstas. En comparación con la condición control, se observa que el tratamiento con Rapa disminuye la frecuencia del fenotipo A en un 24,47% y aumenta la frecuencia del fenotipo B en un 30,67% en la cepa NA. Por otro lado, en la cepa WE se observa un aumento en la frecuencia de fenotipo A en un 23,44%. Las cepas WA, SA y WE no mostraron diferencias significativas en sus porcentajes de sus fenotipos vacuolares. Las diferencias significativas fueron determinadas entre estas condiciones mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,0001$ (****). Los gráficos fueron obtenidos utilizando el Software GraphPad Prism 9.1.1 (n=3).

El tratamiento con Rapa en la cepa NA indujo un cambio en el fenotipo A de 61,97% a 37,50% ($p = 0.0037$; ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett) y en el fenotipo B de 29,45% a 60,12% ($p = 0,0003$; ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett) en comparación con la condición control. Estos cambios indican que efectivamente Rapa a 0,25 nM está actuando como ha sido descrita previamente. Por esta razón, los efectos de esta concentración de Rapa se estudiaron por sí sola, y en combinación con U18 (Rapa-U18).

Posteriormente, se obtuvieron curvas de crecimiento de las cepas parentales WA, SA, NA y WE bajo las condiciones *Mock*, Rapa, U18 y Rapa-U18 (Figura 17).

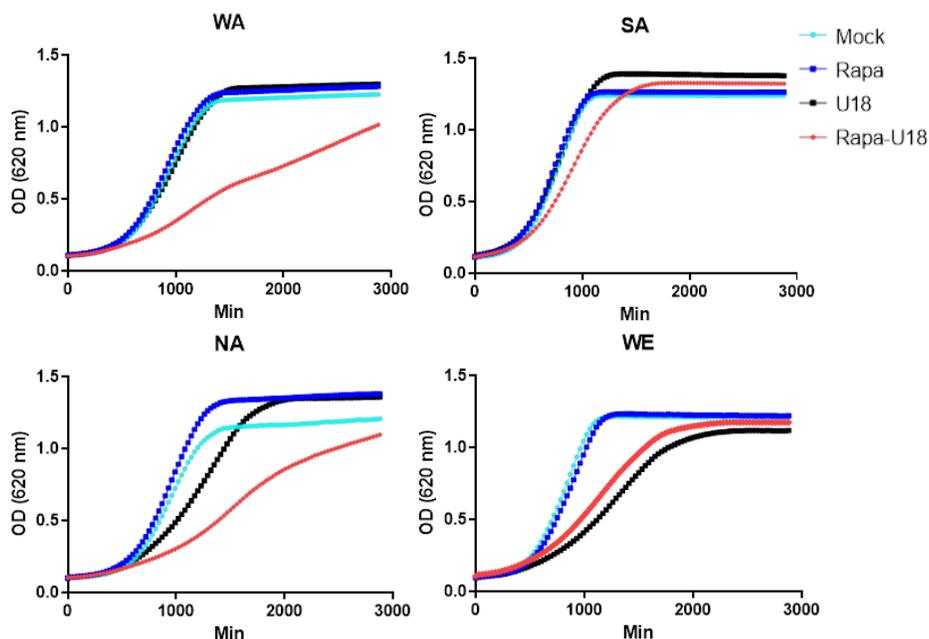


Figura 17. Efecto diferencial sobre el crecimiento de las cepas parentales tratadas con U18 y la combinación Rapa-U18. Se obtuvieron curvas de crecimiento de las cepas parentales WA, SA, NA y WE tratadas con *Mock* (Celeste), Rapamicina (Rapa; 0,25 nM) (Azul), U18666A (U18; 200 μ g/ml) (Negro) y la combinación de Rapa con U18 (Rapa-U18) (Rojo). Corrimientos de la curva de crecimiento hacia la derecha indican toxicidad, dado por un retraso del crecimiento, mientras que desplazamientos hacia la izquierda indican lo opuesto. Rapa por sí mismo no afecta las curvas de crecimiento. U18 induce una disminución del crecimiento en todas las cepas, pero en distintos niveles, con respecto a *Mock*. Rapa-U18 induce una disminución del crecimiento en las cepas WA, SA y NA, pero en distintos niveles con respecto a U18. En la cepa WE el co-tratamiento induce un corrimiento de la curva hacia la izquierda, indicando una tendencia de reversión de los efectos de U18. Los gráficos de OD (620 nm) contra el tiempo en minutos (Min) fueron obtenidos utilizando el Software GraphPad Prism 9.1.1. (n=7).

Los efectos de cada tratamiento sobre el crecimiento fueron cuantificados mediante la normalización de los valores de μ Máx en relación con los valores de μ Máx de *Mock* para cada cepa (μ Máx / μ Máx *Mock*), de esta forma se pudieron apreciar los cambios de μ Máx

(parámetro que representa la capacidad reproductiva) generados por cada tratamiento con respecto a *Mock* (Figura 18).

Cuando la razón $\mu\text{Máx} / \mu\text{Máx Mock}$ es igual a 1, el tratamiento no tiene efectos, mientras que valores superiores a 1, indican efectos positivos, dado por un aumento en la capacidad reproductiva y valores inferiores a 1, indican efectos negativos, dado por la disminución de la capacidad reproductiva.

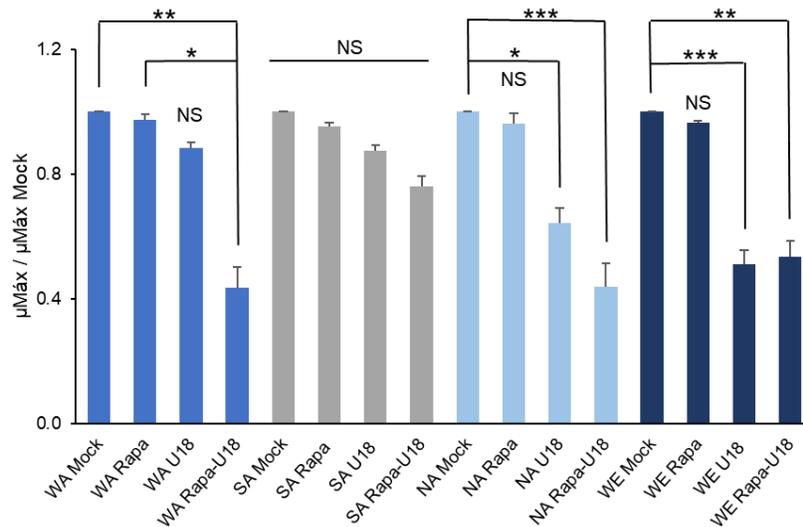


Figura 18. Efecto de los tratamientos de U18 y Rapa-U18 sobre $\mu\text{Máx}$ en las diversas cepas de *S. cerevisiae*. Los $\mu\text{Máx}$ fueron obtenidos para las cepas WA (Azul), SA (Gris), NA (Celeste) y WE (Azul oscuro), bajo las condiciones *Mock*, Rapamicina (Rapa; 0,25 nM), U18666A (U18; 200 $\mu\text{g/ml}$) y la combinación de Rapa con U18 (Rapa-U18). Los resultados están expresados como promedios y las líneas superiores corresponden a los errores estándar. Los valores de $\mu\text{Máx}$ fueron obtenidos utilizando el *Software GrowthRates* (Hall et al., 2014). La cepa WA disminuye su $\mu\text{Máx}$ en la condición Rapa-U18 a diferencia de la condición U18, que no lo afecta. El $\mu\text{Máx}$ de la cepa SA no fue afectado por ninguna de las condiciones de estudio. La cepa NA disminuye su $\mu\text{Máx}$ en las condiciones U18 y Rapa-U18, en esta última en mayor medida. El $\mu\text{Máx}$ de la cepa WE es igualmente afectado por las condiciones U18 y Rapa-U18. Las diferencias significativas entre los valores se determinaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,0001$ (****). El gráfico fue obtenido utilizando el *Software Microsoft Excel* (n=7).

Es importante destacar que, al igual que en los experimentos anteriores, la condición Rapa, tuvo valores de $\mu\text{Máx} / \mu\text{Máx Mock}$ cercanos a 1 en todas las cepas (Figura 18), a pesar de

tener efectos sobre los fenotipos vacuolares (Figura 15), lo que sirvió como un control positivo. Las condiciones U18 y Rapa-U18 tuvieron respuestas diferenciales diferentes, lo que deja apreciar el efecto de Rapa en esta combinación, a pesar de que por sí sola no genere efectos en el mismo fenotipo.

Para U18, las cepas WA y SA presentan un fenotipo de resistencia, dado por sus diferencias no significativas entre sus $\mu\text{Máx} / \mu\text{Máx Mock}$ ($p > 0,9999$ para ambas cepas; prueba de Kruskal-Wallis). Las cepas NA y WE presentan un fenotipo de susceptibilidad por presentar valores de $\mu\text{Máx} / \mu\text{Máx Mock}$ significativamente menores ($p= 0,0331$ y $0,0010$, respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis) (Figura 18), lo cual concuerda con los resultados previamente informados.

Es interesante que el efecto del tratamiento con la combinación Rapa-U18 en la cepa WA cambia a un fenotipo de susceptibilidad, dado por la disminución de $\mu\text{Máx} / \mu\text{Máx Mock}$ a un nivel significativamente menor que 1, mientras que en la cepa SA no se observan cambios diferenciales en comparación con el tratamiento con U18, por mantener su razón cercana a 1. Para la cepa NA, el efecto de la combinación Rapa-U18 incrementa la susceptibilidad en comparación con el tratamiento con U18, lo cual se aprecia por la disminución significativa de $\mu\text{Máx} / \mu\text{Máx Mock}$. Por último, para WE el efecto de U18 y la combinación Rapa-U18 es similar, manteniendo la misma susceptibilidad, indicando que la combinación de las drogas no tiene un efecto adicional sobre los valores de $\mu\text{Máx}$.

El efecto diferencial para cada cepa parental por parte del tratamiento con Rapa-U18 es mejor observado con los valores de $\mu\text{Máx}$ de la combinación Rapa-U18 normalizada con respecto al valor de $\mu\text{Máx}$ del tratamiento con U18 ($\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$) (Figura 19). Esta razón da cuenta del efecto de Rapa en la combinación Rapa-U18 y deja apreciar cómo modifica el efecto de U18 en términos de $\mu\text{Máx}$, para cada una de las cepas.

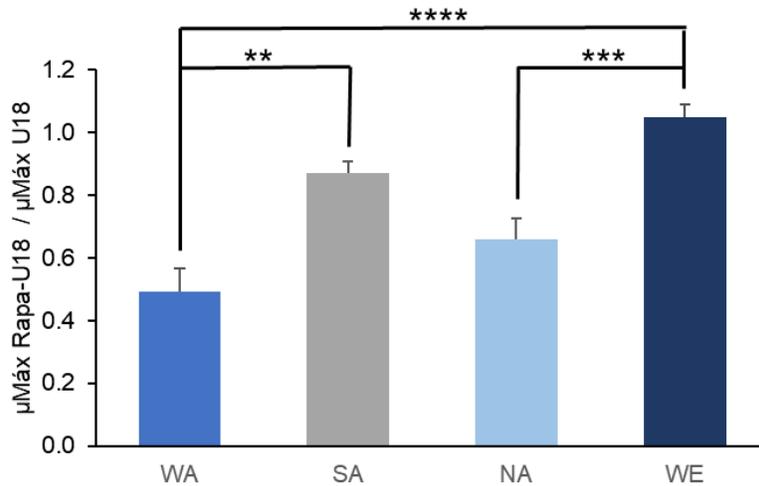


Figura 19. Efecto diferencial de Rapa con respecto a U18. El efecto del tratamiento con Rapamicina (Rapa; 0,25 nM) con respecto a U18666A (U18; 200 µg/ml) fue determinado a través de los promedios de los µMáx de la condición Rapa-U18 normalizados con respecto a los valores de µMáx de la condición U18 (µMáx Rapa-U18 / µMáx U18) para cada cepa. La cepa WA (azul) disminuye mayormente su µMáx con la adición de Rapa. Mientras, las cepas SA (gris) y NA (celeste) lo disminuyen en menor medida. Por otra parte, la cepa WE (azul oscuro) no se ve afectada por la adición de Rapa dado por un valor de este parámetro igual a 1 aproximadamente, por ende, Rapa con respecto a U18 no es tóxica para esta cepa. Los valores de µMáx fueron obtenidos utilizando el *Software GrowthRates* (Hall et al., 2014). Las diferencias significativas entre los valores se determinaron mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,0001$ (****). El gráfico fue obtenido utilizando el *Software Microsoft Excel* (n=7).

Se puede apreciar que solo la cepa WE cuenta con un valor aproximado de 1, dado que Rapa no tiene efectos adicionales en comparación con U18. Además, este valor es significativamente mayor que los valores de las cepas WA y NA ($p < 0,0001$ y $0,0009$, respectivamente; ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey), lo cual respalda que estas cepas son susceptibles a la combinación de las drogas. Mientras, SA no presenta una diferencia significativa con WE ($p = 0,2048$; ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey). Los resultados del tratamiento con Rapa produjeron un efecto cepa-específico sobre las cepas parentales tratadas con U18 (Figura 18 y 19), consistente con lo observado en los modelos murinos con fenotipo NPC previamente mencionados (Figura 7). Las comparaciones realizadas ayudaron a identificar las cepas con los efectos más extremos

en términos de $\mu\text{Máx}$, para su utilización para el mapeo genético, como se especifica en su respectiva sección.

Diferencias encontradas en la fragmentación vacuolar y acumulación de ergosterol.

Se obtuvieron micrografías de microscopio confocal de las cepas parentales marcadas con la sonda FM4-64, para la observación de los fenotipos vacuolares con los tratamientos U18 y Rapa-U18, para compararlos con los obtenidos anteriormente en las condiciones Control y Rapa (Figura 15). Los efectos sobre los fenotipos vacuolares de las condiciones U18 y Rapa-U18 se pueden apreciar en los ejemplos mostrados en la Figura 20.

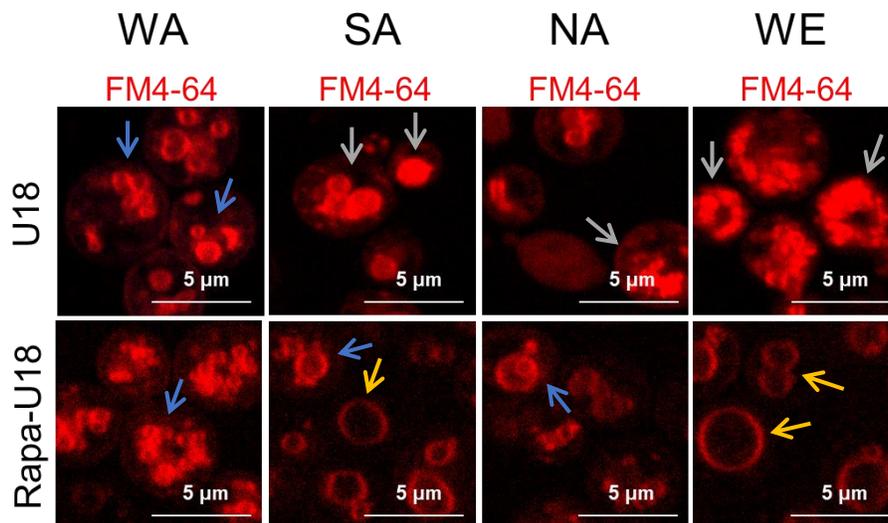


Figura 20. Efecto diferencial de Rapa con respecto a U18 sobre la disgregación vacuolar de las cepas parentales. Imágenes representativas de las cepas parentales WA, SA, NA y WE bajo las condiciones U18666A (U18; 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y la combinación de Rapa a 0,25 nM con U18 (Rapa-U18), por 24 horas. Las vacuolas fueron marcadas con FM4-64. Para la cepa WA el tratamiento conjunto lleva a un mayor número de vacuolas por célula, en comparación con U18. Pueden observarse más células con los fenotipos B y C, las que fueron indicadas por flechas azules y grises, respectivamente, siendo las más representativas de cada fenotipo en particular. Para las cepas SA, NA y WE, el co-tratamiento lleva a la disminución del número de vacuolas por célula, en comparación con U18. Pueden observarse más células con fenotipo A, las que fueron indicadas por flechas amarillas, siendo las más representativas de este fenotipo. Microscopía confocal 63X, zoom óptico 5X. Barra de escala 5 μm .

A partir de las micrografías de las células marcadas con FM4-64, se cuantificaron los fenotipos vacuolares (Figura 21). Se observaron diferencias en los porcentajes de los fenotipos vacuolares de las cepas parentales en todas las condiciones.

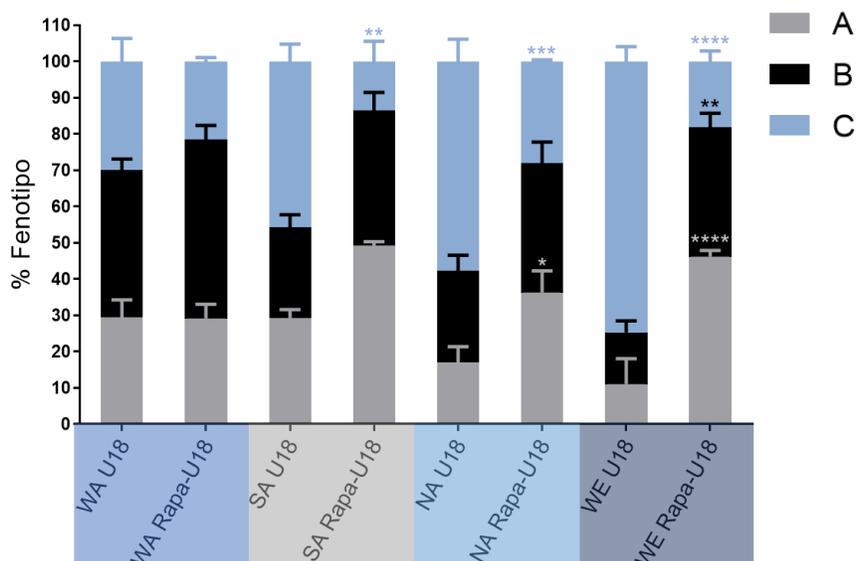


Figura 21. Cuantificación de los fenotipos vacuolares A, B y C de las cepas parentales de *S. cerevisiae* bajo las condiciones U18 y Rapa-U18. Los porcentajes de los fenotipos vacuolares A (gris), B (negro) y C (celeste), de las cepas parentales WA, SA, NA y WE, bajo las condiciones U18666A (U18; a 200 µg/ml) y la combinación de Rapa a 0,25 nM con U18 (Rapa-U18), por 24 horas, están expresados como promedios y las líneas superiores corresponden a sus errores estándar. Las células con fenotipo vacuolar A se caracterizan por tener 1 o 2 vacuolas en su citoplasma. Las células con fenotipo B tienen 3 o más vacuolas. Para las células con fenotipo C se dificulta la determinación del número de vacuolas, debido a una alta disgregación de éstas. En comparación con la condición U18, el tratamiento con Rapa-U18 en la cepa SA disminuye la frecuencia del fenotipo C en un 32,22%, mientras que en la cepa NA aumenta la frecuencia del fenotipo A en un 19,19% y disminuye la frecuencia del fenotipo C en un 29,62%. En la cepa WE aumenta la frecuencia del fenotipo A en un 35,16% y fenotipo B en un 21,4% y disminuye la frecuencia del fenotipo C en un 56,57%. En resumen, las cepas SA, NA y WE tratadas con Rapa-U18 revierten la disgregación vacuolar inducida por U18, a diferencia de la cepa WA, donde no se observan cambios significativos entre estas condiciones. Las diferencias significativas fueron determinadas entre estas condiciones mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,0001$ (****). Los gráficos fueron obtenidos utilizando el *Software GraphPad Prism 9.1.1* (n=3).

Se encontraron diferencias importantes en la frecuencia de fenotipos vacuolares de las cepas bajo las condiciones U18 y Rapa-U18. En todas las cepas parentales excepto por WA, se observó un efecto de reversión de los efectos de U18, con respecto a Rapa-U18, especialmente por una disminución de la frecuencia del fenotipo C, dado por la disminución de su disgregación vacuolar. Este efecto puede ser mayormente apreciado en la cepa WE, a pesar de que no se observaron efectos significativos en el parámetro $\mu\text{Máx}$ / $\mu\text{Máx Mock}$ (Figura 18). Para esta cepa bajo la condición U18 se observó un 74,69% de fenotipo C, mientras que bajo la condición Rapa-U18 se observó un 18,12% de fenotipo C (<0.0001 ; ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett), lo que indica que Rapa logra revertir los efectos de U18 sobre este fenotipo vacuolar y acercarlo a la proporción observada en la condición Control. Contrario a lo esperado, se observó también una reversión en las cepas parentales SA y NA, aunque en menor medida ($p = 0.0010$ y 0.0005 , respectivamente; ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett), debido a que difiere a lo observado a nivel de los $\mu\text{Máx}$.

Los resultados indican que la cepa WE muestra ser la menos afectada a la combinación de drogas para ambos rasgos analizados, $\mu\text{Máx}$ y fenotipos vacuolares. En el caso de $\mu\text{Máx}$, se observa una disminución considerable en las condiciones U18 y Rapa-U18, con valores de 0,110 y 0,115, respectivamente, en comparación con la condición *Mock* con un valor de $\mu\text{Máx}$ de 0,221. Por lo tanto, no se encuentra un efecto diferencial significativo entre las condiciones U18 y Rapa-U18 para este parámetro. Sin embargo, en los fenotipos vacuolares, específicamente en el porcentaje de fenotipo C, se observa 74,69% en la condición U18, mientras que en la condición control es del 11,31% y en la combinación Rapa-U18 es del 18,12%, lo que muestra una reversión del fenotipo con U18 casi a la condición control al ser tratado con la combinación Rapa-U18, razón por la cual no posee una diferencia significativa.

Además, se obtuvieron correlaciones de los porcentajes de cada fenotipo vacuolar, con los $\mu\text{Máx}$ de cada condición estudiada (Figura 22). Donde se observó una alta correlación, determinada por el coeficiente de correlación de Spearman (r), entre los $\mu\text{Máx}$ de la condición U18 con los fenotipos vacuolares A y C, al igual que los $\mu\text{Máx}$ de la condición Rapa-U18 con el fenotipo A. Sin embargo, ninguna de las correlaciones resultó significativa, lo que indica que las variables estudiadas no se encuentran correlacionadas, este resultado también puede ser debido al bajo número muestral ($n=4$).

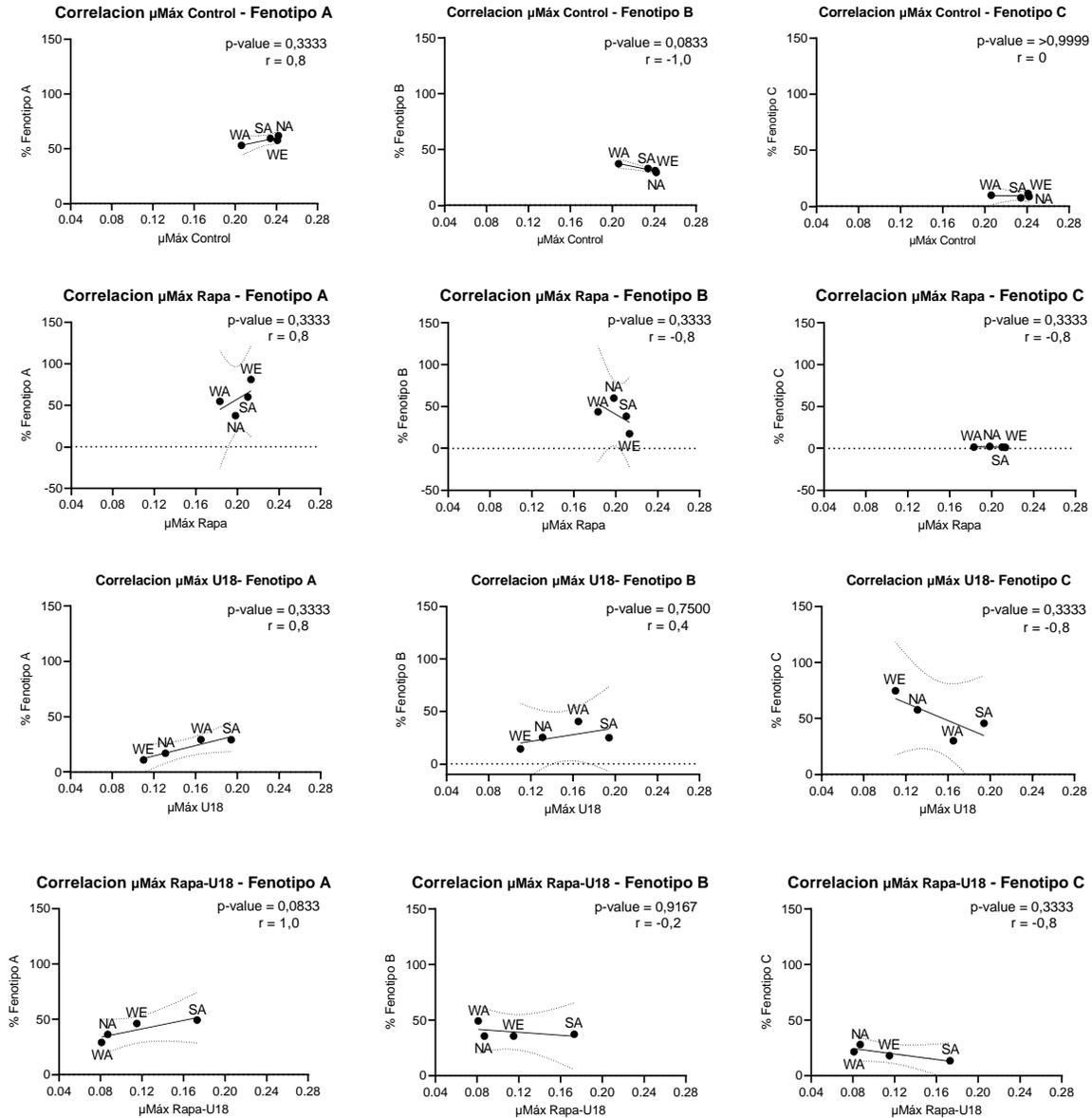


Figura 22. Correlaciones entre los porcentajes de los fenotipos vacuolares A, B y C con los μMáx por condición. Para cada correlación se utilizaron los promedios de los μMáx y porcentajes de cada fenotipo vacuolar de las cepas parentales WA, SA, NA y WE bajo las condiciones Control, Rapamicina (Rapa; 0,25 nM), U18666A (U18; 200 μg/ml) y la combinación de Rapa con U18 (Rapa-U18). Se incluyen líneas de tendencia, el rango de confianza (entre las curvas discontinuas) y los parámetros estadísticos p y coeficiente de correlación de Spearman (r). Las correlaciones fueron obtenidas mediante la prueba de Spearman. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,0001$ (****). Los gráficos fueron obtenidos utilizando el *Software GraphPad Prism 9.1.1*.

Posteriormente, para la observación del ergosterol intracelular se realizaron tinciones con filipina para las condiciones Rapa y Rapa-U18, las que fueron fotografiadas en microscopio de fluorescencia (Figura 23).

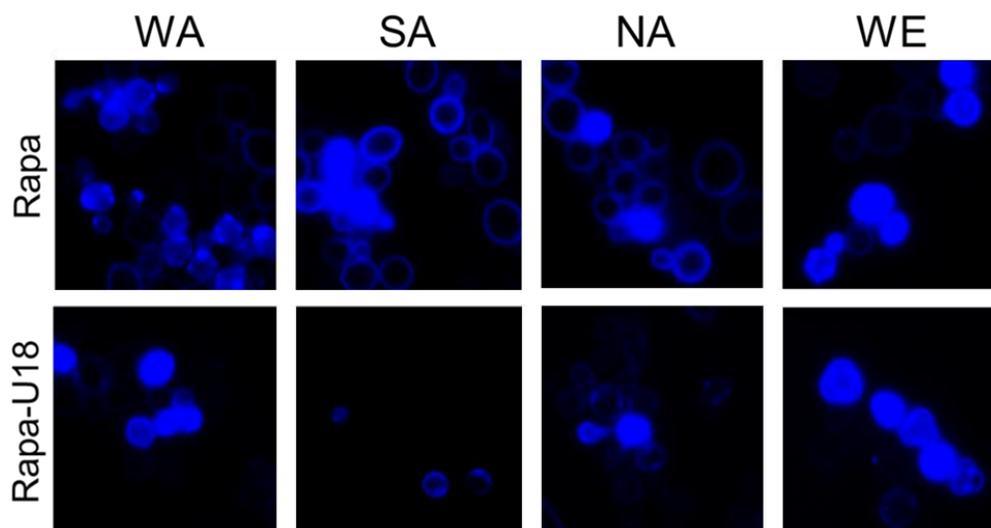


Figura 23. Efecto de U18 con respecto a Rapa sobre los niveles de filipina en *S. cerevisiae* de diversos *backgrounds* genéticos. Imágenes representativas de las cepas parentales WA, SA, NA y WE bajo las condiciones Rapamicina (Rapa; 0,25 nM) y la combinación de Rapa con U18 a 200 µg/ml (Rapa-U18), por 24 horas. En las células tratadas con Rapa se observa marca de filipina tanto en la membrana celular como intracelularmente. En las células tratadas con la combinación de Rapa-U18, la marca de filipina predomina de forma uniforme. Microscopía UV visible 100X, velocidad de adquisición 600 ms.

La intensidad de la tinción con filipina fue cuantificada a través del parámetro CTCF a partir de las micrografías obtenidas para todas las condiciones de estudio (Figuras 13 y 23). Los CTCF obtenidos fueron normalizados con respecto a los CTCF de la condición Control ($CTCF / CTCF \text{ Control}$) (Figura 24). Así fue posible la obtención de resultados con diferencias significativas entre las cantidades de ergosterol detectadas, observándose efectos cepa-específicos.

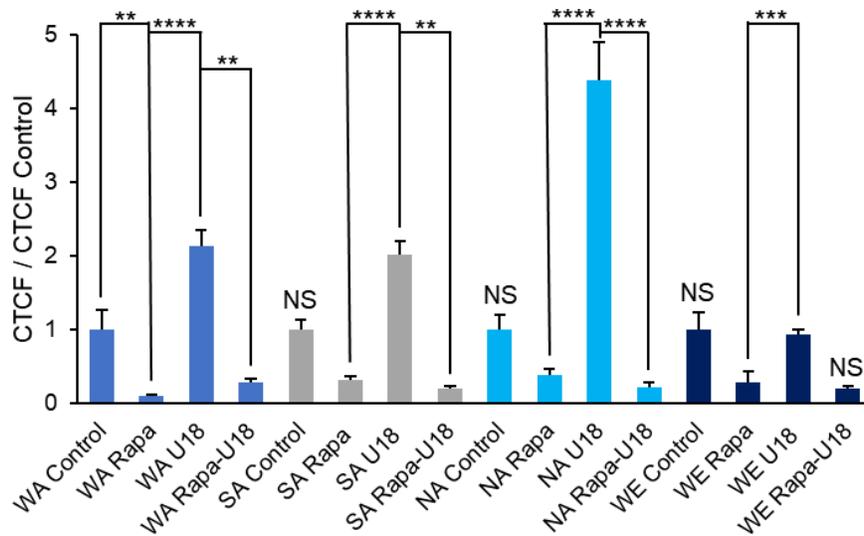


Figura 24. Valores de CTCF normalizados con respecto a los valores de CTCF del control para cada cepa parental. La intensidad de fluorescencia de la filipina (CTCF) de las cepas parentales WA (Azul), SA (Gris), NA (Celeste) y WE (Azul oscuro), bajo las condiciones Control, Rapamicina (Rapa; 0,25 nM), U18666A (U18; 200 µg/ml) y la combinación de Rapa con U18 (Rapa-U18), fue normalizada con respecto al Control, expresadas como promedios y las líneas superiores corresponden a los errores estándar. Estos valores son proporcionales a los niveles de ergosterol en las células presentes en las imágenes obtenidas. Para todas las cepas los mayores niveles de CTCF fueron en las cepas bajo la condición U18. Los menores valores de CTCF fueron en las cepas bajo la condición Rapa. Es interesante que las cepas bajo la condición Rapa-U18 poseen niveles de CTCF menores a las cepas bajo la condición U18, siendo similar al observado sobre los fenotipos vacuolares, así el aumento de ergosterol inducido por U18 es revertido por Rapa. Los valores de CTCF fueron obtenidos utilizando el *Software ImageJ*. Las diferencias significativas entre los valores se determinaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis. $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) y $p \leq 0,0001$ (****). El gráfico fue obtenido utilizando el *Software Microsoft Excel*.

Las cepas bajo la condición U18, mostraron las mayores cantidades de ergosterol. Bajo la condición Rapa-U18 se aprecia una menor cantidad de ergosterol en comparación con U18, la cual fue significativamente menor en todas las cepas excepto por WE ($p = 0,0036$, $0,0095$, $< 0,0001$ y $0,1566$, respectivamente para las cepas WA, SA, NA y WE; prueba de Kruskal-Wallis).

Genes moduladores del efecto de Rapa.

Se realizaron mapeos de QTL utilizando el rasgo $\mu\text{Máx}$ de las curvas de crecimiento en las 96 cepas segregantes correspondientes al cruce WA x WE. Fue seleccionado este cruce debido a que estas cepas parentales por sí solas mostraron una respuesta a Rapa-U18 diferente, donde la cepa WA fue susceptible y la cepa WE fue resistente (Figura 19). Esta diferencia se atribuye a su divergencia genética.

Las 96 segregantes fueron fenotipificadas en quintuplicado bajo las condiciones *Mock*, Rapa, U18 y Rapa-U18. Se obtuvieron los valores de $\mu\text{Máx}$ para cada segregante y posteriormente se seleccionaron las 3 réplicas con mayor reproducibilidad (Figura 25). Sus promedios fueron utilizados para obtener los valores normalizados de $\mu\text{Máx}$ de la condición Rapa con respecto a $\mu\text{Máx}$ de la condición *Mock* ($\mu\text{Máx Rapa} / \mu\text{Máx Mock}$) y los valores de $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$.

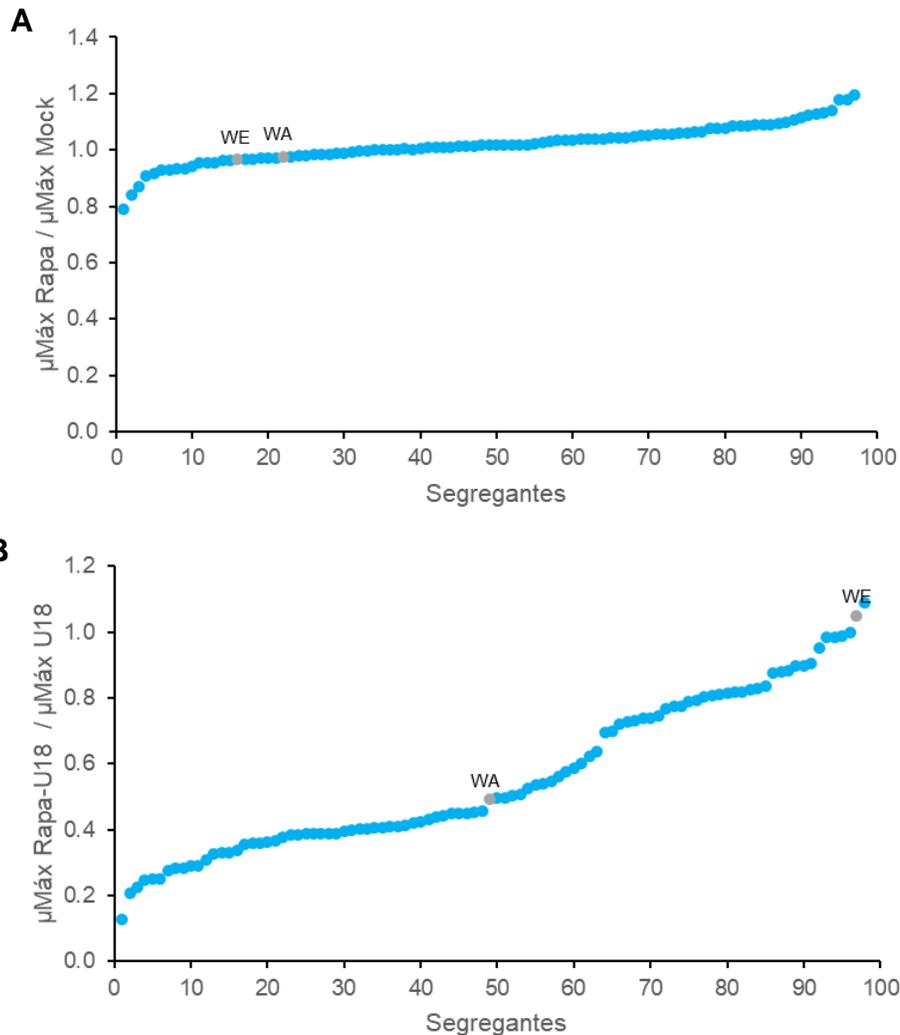


Figura 25. Variación fenotípica entre las segregantes de las cepas WE x WA frente a diversos tratamientos. Las segregantes poseen diferentes comportamientos al tratarse con Rapa frente a *Mock* y U18 en base a sus promedios de $\mu_{\text{Máx}}$. Los parámetros estudiados fueron: $\mu_{\text{Máx Rapa}} / \mu_{\text{Máx Mock}}$ que representa el efecto de Rapa a 0,25 nM con respecto a *Mock* (**A**) y $\mu_{\text{Máx Rapa-U18}} / \mu_{\text{Máx U18}}$ que representa el efecto de Rapa a 0,25 nM con respecto a U18 a 200 $\mu\text{g/ml}$ (**B**). En cada caso estos parámetros fueron ordenados de menor a mayor. Con ambos parámetros se pueden apreciar segregantes transgresoras, por poseer un fenotipo fuera del rango determinado por las cepas WA y WE. El efecto de Rapa frente a U18 es heterogéneo en comparación con el efecto de Rapa. Esto puede ser debido a la divergencia genética entre las cepas, con genes que pueden estar asociados a la respuesta diferencial de Rapa con respecto a U18. Los valores de $\mu_{\text{Máx}}$ se obtuvieron utilizando el *Software GrowthRates* (Hall et al., 2014). Los gráficos fueron obtenidos utilizando el *Software Microsoft Excel* (n=3).

Los valores $\mu\text{Máx Rapa} / \mu\text{Máx Mock}$ y $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$ permitieron realizar mapeos de QTL para identificar regiones del genoma que están asociadas con la variación de $\mu\text{Máx}$ en respuesta a Rapa con respecto a *Mock* y a U18 (para determinar su efecto en un contexto de NPC), respectivamente.

En el mapeo genético en función de $\mu\text{Máx Rapa} / \mu\text{Máx Mock}$ (Figura 26), no se apreciaron picos significativos, lo que es esperable dado que no existieron diferencias significativas en los $\mu\text{Máx}$ de las curvas de crecimiento de las cepas parentales tratadas con Rapa.

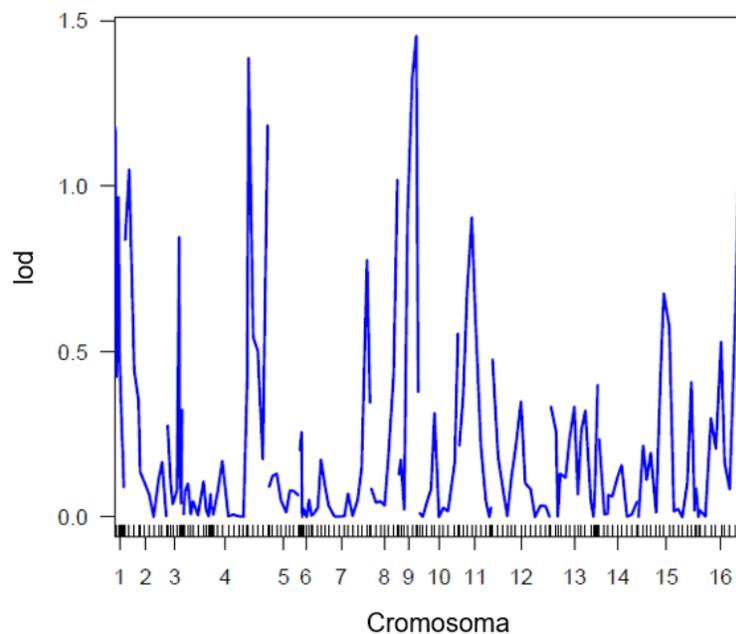


Figura 26. Mapeo de QTL en función de la respuesta a Rapa. Se utilizó como rasgo los valores de $\mu\text{Máx}$ de la condición Rapa normalizados por los $\mu\text{Máx}$ de la condición *Mock*. No se identificaron picos significativos en el LOD plot.

El mapeo genético en función de $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$ (Figura 27) reveló un pico significativo en el cromosoma 13, por superar un lod de 2.67, dado por el marcador STB2, donde pueden existir genes/variantes que modifiquen el efecto de Rapa en un fenotipo similar a NPC. Esta región contiene genes que, ya sea de manera individual o en combinación, parecen tener un efecto significativo en la modulación de la respuesta a Rapa-U18.

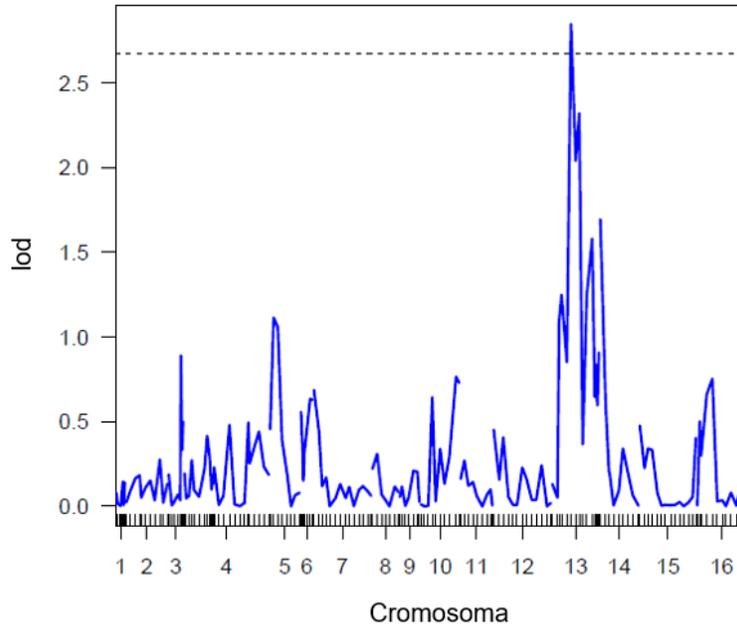


Figura 27. Mapeo de QTL en función de la respuesta a Rapa en relación a U18. Se utilizó como rasgo los valores de μ Máx de la condición Rapa-U18 normalizados por los μ Máx de la condición U18. Se identificó un locus significativo que sobrepasa el umbral de significancia empírico de 2.67 en el cromosoma 13, dado por el marcador STB2.

Para identificar potenciales genes moduladores del efecto de Rapa, se estudiaron los genes encontrados 40 kb río arriba y 40 kb río abajo del marcador STB2, lo que resultó en la identificación de 38 genes. Se utilizaron los siguientes criterios de priorización de los potenciales genes moduladores: i) poseer ortólogos humanos, ii) variantes no sinónimas diferenciales entre las cepas parentales, que además se correlacionen con el efecto de Rapa con respecto a U18, tomando como referencia los valores de μ Máx Rapa-U18 / μ Máx U18 y, por último, iii) que los ortólogos de ratón de estos genes tengan variantes no sinónimas entre las cepas C57BL/6J y FVB/NJ dado que ratones NPC en estos *backgrounds* genéticos mostraron una respuesta diferencial a Rapa (Figura 28). Al cumplir estas condiciones, los genes poseen una mayor probabilidad de que puedan estar implicados en los efectos estudiados.

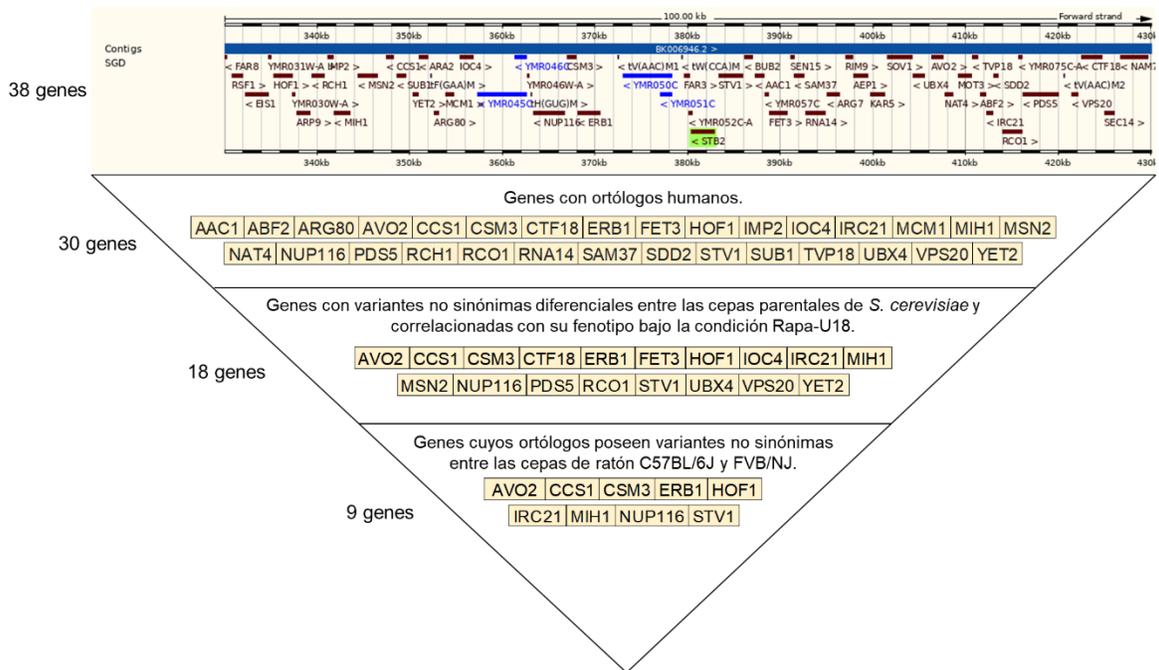


Figura 28. Criterios de priorización de los genes cercanos al pico de ligamiento en respuesta de Rapa con respecto a U18. A los 38 genes cercanos al pico significativo del mapeo de QTL que utilizó como rasgo $\mu\text{Máx}$ Rapa-U18 / $\mu\text{Máx}$ U18, se les aplicaron los siguientes criterios de priorización: 1) genes que poseen ortólogos humanos, lo que redujo la lista a 30 genes; 2) genes con variantes no sinónimas entre las cepas parentales WA, SA, NA y WE, que se correlacionaron con su fenotipo de interés (según el parámetro $\mu\text{Máx}$ Rapa-U18 / $\mu\text{Máx}$ U18), lo que redujo la lista a 18 genes; 3) genes cuyos ortólogos de ratón poseen variantes no sinónimas entre las cepas C57BL/6J y FVB/NJ. Como resultado se identificaron 9 genes como potenciales moduladores a la respuesta de Rapa con respecto a U18.

Se encontraron 18 genes (Figura 28) que presentan variantes no sinónimas entre las cepas parentales, que además se correlacionan con su fenotipo de $\mu\text{Máx}$ frente a Rapa-U18 con respecto a U18 (Tabla 1). Para estos genes se identificaron sus ortólogos de ratón, y se buscaron variantes no sinónimas presentes en estos genes entre las cepas C57BL/6J y FVB/NJ.

Genes de <i>S. cerevisiae</i> (ORT_Raton)	POS (bp)	REF_AA	ALT_AA	AA_POS	Predicción_SIFT
AVO2 (Cttnbp2)	406917	G	A	205	Tolerado
CCS1 (Ccs)	347780	N	D	161	Tolerado
CSM3 (Tipin)	367507	F	S	176	Tolerado
	367636	L	P	219	Tolerado
	367662	D	N	228	Tolerado
	367810	S	N	277	Tolerado
CTF18 (Chtf18)	422714	N	S	672	Tolerado
	423603	S	T	376	Tolerado
ERB1 (Bop1)	370246	G	E	91	Tolerado
FET3 (Cp y Heph1)	389274	D	E	151	Tolerado
	390358	L	I	513	Tolerado
HOF1 (Pstpip1, Pstpip2 y Gas7)	335383	R	K	29	Tolerado
	335404	L	H	36	Tolerado
	336784	G	E	496	Tolerado
	336802	A	E	502	Tolerado
IOC4 (Hdgf, Hdgfl1, Hdgfl2, Hdgfl3 y Psip1)	355571	M	T	63	Tolerado
	355763	M	T	127	Tolerado
IRC21 (Cyb5r4)	412378	I	L	166	Tolerado
	412783	A	T	31	Tolerado
MIH1 (Cdc25a, Cdc25b y Cdc25c)	342743	S	P	260	Tolerado
MSN2 (Sp2)	346157	G	P	121	Tolerado
NUP116 (Nup98)	365100	S	G	536	Tolerado
PDS5 (Pds5a y Pds5b)	417062	V	I	990	Tolerado
	418982	A	T	350	Tolerado
RCO1 (Phf12)	414447	P	S	156	Tolerado
STV1 (Atp6v0a1, Atp6v0a2, Atp6v0a4 y Tcirg1)	383408	S	G	36	Tolerado
UBX4 (Aspscr1)	405305	F	S	90	Tolerado
VPS20 (Chmp6)	421535	F	L	205	Tolerado
	421708	L	V	148	Tolerado
YET2 (Bcap31)	350595	R	K	72	Tolerado

Tabla 1. Variantes no sinónimas en genes de *S. cerevisiae* que se correlacionan con el efecto de Rapa en relación con U18 en términos de μ Máx. Posición en bp en el cromosoma 13 (POS), aminoácido de referencia (REF_AA), aminoácido por el que cambia (ALT_AA), la posición del aminoácido dentro de la proteína (AA_POS) y la predicción de *software SIFT* del efecto de la variación. Se indican sus ortólogos de ratón. La información fue proporcionada por el *software SIFT*. La tabla fue obtenida utilizando el *Software Microsoft Excel*.

Se seleccionaron 9 genes cuyos ortólogos de ratón presentan variantes no sinónimas entre las cepas C57BL/6J y FVB/NJ, las que son apreciadas en la Tabla 2. Estas cepas de ratón previamente mostraron una respuesta diferencial a Rapa en un contexto de NPC (Figura 7). Razón por la cual, este hallazgo aumenta la probabilidad de que los genes seleccionados puedan estar involucrados en el efecto diferencial descrito.

Genes de Ratón (ORT_ <i>S. cerevisiae</i>)	Crom	POS (bp)	C57_AA	FVB_AA	POS_AA	Predicción_SIFT
Cttnbp2 (AVO2)	6	18382784*	S	S	1328	Tolerado
		18406462	L	M	102	Deletéreo
Ccs (CCS1)	19	4825951	Q	R	187	Tolerado
Tipin (CSM3)	9	64304427	C	F	265	Tolerado
Bop1 (ERB1)	15	76474848	L	S	56	Tolerado
Pstpip1 (HOF1)	9	56126644	V	I	301	Tolerado
Cyb5r4 (IRC21)	9	87040451	D	G	171	Tolerado
		87055827	F	L	300	Tolerado
		87057232	C	Y	356	Tolerado
		87058957	D	N	388	Tolerado
		87066697	Q	K	79	Tolerado
Cdc25a (MIH1)	9	109889062	G	S	304	Tolerado
Nup98 (NUP116)	7	101779092*	V	I	1330	Tolerado
Atp6v0a4 (STV1)	6	38087961	T	A	161	Tolerado
Tcirg1 (STV1)	19	3897668	A	S	564	Tolerado
		3904246	R	Q	56	Deletéreo

Tabla 2. Variantes no sinónimas entre las cepas de ratón C57BL/6J y FVB/NJ de los genes ortólogos de *S. cerevisiae* seleccionados. Para cada gen es informado su cromosoma (Crom), la posición de sus variantes en pares de bases (POS), aminoácido afectado por variante de C57BL/6J (C57_AA) y FVB/NJ (FVB_AA), posición del aminoácido dentro de la proteína (POS_AA) y la predicción de SIFT del efecto de cada variante (Predicción_SIFT). Además, se indican sus ortólogos de *S. cerevisiae*. La información fue obtenida con el software SIFT y la herramienta GenomeMUSter Search. Las variantes con un asterisco (*) en su posición, fueron informadas solo por GenomeMUSter Search como no sinónimas, ya que igualmente pueden generar efectos. La tabla fue obtenida utilizando el Software Microsoft Excel.

Los 9 genes seleccionados fueron *AVO2*, *CCS1*, *CSM3*, *ERB1*, *HOF1*, *IRC21*, *MIH1*, *NUP116* y *STV1*. Como es indicado, estos genes cumplieron con los criterios de selección. Asimismo, las variantes no sinónimas (las cuales fueron priorizados por sobre las sinónimas por tener un efecto más probable y predecible sobre la proteína resultante) de los genes seleccionados muestran una posible correlación con los valores de $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$ (Tabla 3). Estas variantes se encuentran en las cepas parentales con los menores valores de $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$, sugiriendo que podrían estar asociadas con una mayor sensibilidad a Rapa-U18.

Genes moduladores potenciales	Cepas parentales			
	WA	SA	NA	WE
<i>AVO2</i>	X	X	X	
<i>CCS1</i>	X	X	X	
<i>CSM3</i>	X	X	X	
<i>ERB1</i>	X	X	X	
<i>HOF1</i>	X	X	X	
<i>IRC21</i>	X	X	X	
<i>MIH1</i>	X	X	X	
<i>NUP116</i>	X		X	
<i>STV1</i>	X	X	X	
$\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$	0,492	0,871	0,658	1,048

Tabla 3. Variantes no sinónimas de los potenciales genes moduladores presentes en cada cepa parental. Se indica con una "X" las cepas en que se encuentran la o las variantes anteriormente descritas para los 9 genes identificados como potencial modulador de la respuesta de Rapa con respecto a U18. Las variantes se encuentran en las cepas WA, SA y NA, excepto por las presentes en el gen *NUP116*, donde su variante está presente en las cepas WA y NA. En todos los casos se encuentran en las cepas con valores de $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$ menor a uno. Por este motivo estas variantes son relacionadas con una mayor susceptibilidad a Rapa frente a U18. La tabla fue obtenida utilizando el *Software Microsoft Excel*.

Entre los genes seleccionados, aquellos que pueden estar directamente asociados a la respuesta a Rapa corresponden a *AVO2* y *STV1*, debido a que sus ortólogos de ratón

presentan variantes no sinónimas que se predicen como deletéreas (Tabla 2), lo que quiere decir que pueden tener efectos en las proteínas que codifican. *AVO2* codifica una subunidad de TORC2, el cual puede ser modulado por tratamientos crónicos de Rapa (Schreiber et al., 2015). Además, al igual que su ortólogo humano, la proteína de unión a cortactina 2 (CTTNBP2), *AVO2* está involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina. CTTNBP2 se encuentra altamente expresada en el cerebro y está asociada con trastornos neurológicos (Chen & Hsueh, 2012; Wullschleger et al., 2005).

STV1 codifica a una subunidad del dominio vacuolar ATPasa V0, responsable de la acidificación vacuolar mediante su actividad transportadora de protones (Manolson et al., 1994).

STV1 posee diversos ortólogos humanos que codifican proteínas que cumplen su misma función, donde destacan *ATP6V0A4* y *TCIRG1*, cuyos ortólogos de ratón, a diferencia de los demás, presentan variantes no sinónimas entre las cepas C57BL/6J y FVB/NJ con una predicción de efecto deletante para la variante presente en *TCIRG1* (Tabla 2).

Por estas razones, *AVO2* y *STV1* fueron seleccionados como los principales candidatos a ser genes moduladores de la respuesta a Rapa en un contexto de NPC.

Discusión

La variabilidad en la patología y respuesta a tratamientos en NPC

La enfermedad de NPC se caracteriza por una amplia variedad de síntomas viscerales, neurológicos y psiquiátricos. Estos síntomas van desde una forma neonatal de progresión rápida hasta una condición neurodegenerativa crónica de inicio en la edad adulta (Bianconi et al., 2019; S. Y. Lee et al., 2016). Esta gran variabilidad también se observa en efectos diferenciales del tratamiento con Rapa, observados en modelos celulares humanos (Elrick et al., 2012; Maetzel et al., 2014), murinos (Figura 7) (Calderón & Klein, 2018) y en *S. cerevisiae* en el presente estudio (Figura 19).

En la presente investigación se buscó profundizar en el entendimiento del efecto diferencial de Rapa, a través de la identificación de potenciales genes moduladores, cuyas variantes posiblemente se encuentren modulando la respuesta a este fármaco.

La identificación de variantes genéticas asociadas a genes moduladores de un trastorno como NPC puede mejorar la comprensión de la base molecular de la enfermedad y, con frecuencia, conducen al desarrollo de métodos de diagnóstico y tratamientos personalizados más eficaces, basados en la biología de cada individuo (farmacogenómica) (Kosorok & Laber, 2019; Steinmetz et al., 2002; van der Lee et al., 2021).

La importancia de la autofagia en la enfermedad de NPC

La autofagia es un mecanismo crucial de degradación y reciclaje de proteínas, juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular y es activada en respuesta a situaciones extremas, como la falta de nutrientes o de alimento (Sarkar et al., 2013). Una vez activada, parte del citoplasma y organelos quedan secuestrados dentro de una vacuola limitada por una doble membrana denominada autofagosoma. Los autofagosomas experimentan una maduración progresiva, por la adquisición de proteínas de membrana lisosomal, pH ácido y enzimas proteolíticas mediante la fusión de endosomas tempranos y tardíos e incluso con lisosomas (Ishibashi et al., 2009).

El flujo autofágico abarca la formación de autofagosomas y su fusión con endosomas tardíos para formar anfisomas. Estos posteriormente se fusionan con los lisosomas formando los autolisosomas, los que finalmente degradan su carga (Menon & Dhamija, 2018; Sarkar et al., 2013).

Los lisosomas son organelos esenciales para la degradación y reciclaje de componentes celulares, incluyendo lípidos. A través de la autofagia, también ayudan a la eliminación de componentes celulares dañinos (Davis et al., 2021). Además de sus funciones catabólicas, los lisosomas se han caracterizado como compartimentos de señalización que regulan la actividad de mTORC1, similar que en *S. cerevisiae* en sus vacuolas y TORC1. Por este motivo, Rapa es capaz de modificar estas funciones a través de la inhibición de TORC1 (Davis et al., 2021; Jin et al., 2022).

En este trabajo se utilizó una concentración de Rapa que no afectó el parámetro de crecimiento $\mu_{Máx}$ en las cepas parentales de *S. cerevisiae* utilizadas (Figura 18). Sin embargo, este tratamiento afectó la fisiología de estas células, con efectos en la fragmentación de sus vacuolas en la condición control (Figura 15) y disminución de los niveles de ergosterol apreciados a través de CTCF en células tratadas con U18 (Figura 24).

Los diferentes efectos observados entre el parámetro de crecimiento $\mu_{\text{Máx}}$ y parámetros fisiológicos tal como la proporción de fenotipos vacuolares B y C, muestran que estos parámetros fisiológicos poseen mayor sensibilidad al tratamiento con Rapa (Figura 16). Más aún, la autofagia también regula el metabolismo de lípidos, incluyendo el colesterol. Los lípidos son componentes estructurales esenciales de las membranas y gobiernan el tráfico intracelular (Liedtke et al., 2022; Sarkar et al., 2013; Singh et al., 2009). Por lo tanto, cuando existe un deterioro en los procesos autofágicos, pueden contribuir a la generación de fenotipos relacionados con enfermedades neurodegenerativas y hepáticas (Sarkar et al., 2013). Particularmente, en la enfermedad de NPC, la alteración de la autofagia puede ser asociada a la acumulación de colesterol, donde la maduración de autofagosomas se ve afectada debido a la formación defectuosa de autofagosomas (Liedtke et al., 2022; Sarkar et al., 2013).

El rol del colesterol en los autofagosomas tardíos no se encuentra completamente comprendido. Se ha hipotetizado que los autofagosomas tardíos requieren colesterol para proteger las membranas limitantes de las vacuolas contra enzimas proteolíticas. Este proceso estaría afectado en la enfermedad de NPC, provocando una baja disponibilidad de colesterol ya que se retiene dentro de los lisosomas (Ishibashi et al., 2009; Sarkar et al., 2013).

Es relevante destacar que la deficiencia de la actividad de NPC1, o bien de NCR1 en *S. cerevisiae* afecta el transporte de lípidos endocitados, y el flujo autofágico (Figura 29). Esto resulta en una acumulación de lisosomas / vacuolas autofágicas y esteroides en las células (Liedtke et al., 2022; Meske et al., 2014; Sarkar et al., 2013).

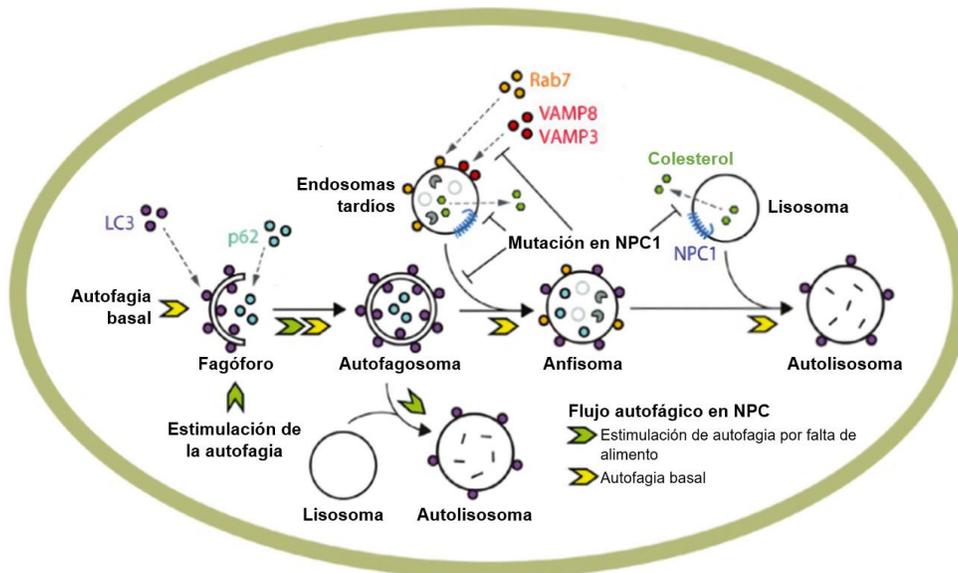


Figura 29. La disfunción de la autofagia en NPC. Mutaciones de pérdida de función en *NPC1* afectan la maduración del autofagosoma, lo que resulta en un bloqueo de la autofagia y la acumulación de autofagosomas. Fue determinado con la utilización del marcador de autofagosomas LC3 y el seguimiento de sustratos de autofagia, tal como p62. La regulación positiva de la autofagia, como la inducida por falta de alimento, nutrientes o Rapa, podría prevenir el bloqueo de la autofagia en las células mutantes *NPC1* y revertir los defectos de la autofagia al facilitar la maduración del autofagosoma a través de su fusión con lisosomas. Figura modificada de Sarkar y colaboradores (Sarkar et al., 2013).

Se observó que las cepas parentales tratadas con U18 presentaron incrementos significativos en los niveles de ergosterol (Figura 24), debido a la inhibición de *NCR1*. Es probable que esta inhibición altere el flujo autofágico.

Con respecto a los fenotipos vacuolares, la condición con la mayor fragmentación vacuolar en las cepas parentales fue U18 (fenotipo C) (Figura 21). Esto podría estar relacionado con un aumento del estrés intracelular que además provoca una disminución del parámetro $\mu_{M\acute{a}x}$ (Figura 18).

Nos hemos preguntado cómo la inducción de la autofagia por parte de Rapa puede tener efectos positivos o negativos sobre este flujo. A pesar del aumento en la generación de autolisosomas, se puede producir una disfunción en la degradación de su carga, lo que estaría generando una mayor acumulación de esteroides (Figura 30) (Elrick et al., 2012; Yadati et al., 2020).

Es interesante preguntarse qué diferencia el efecto sobre cada cepa parental, debido a que las cepas tratadas con la combinación Rapa-U18 mostraron diferencias significativas en los fenotipos vacuolares obtenidos (Figura 21). Estas diferencias pueden estar relacionadas con lo observado anteriormente en modelo murino (Figura 7), debido a que en ambos modelos pueden ser alterados los mismos procesos.

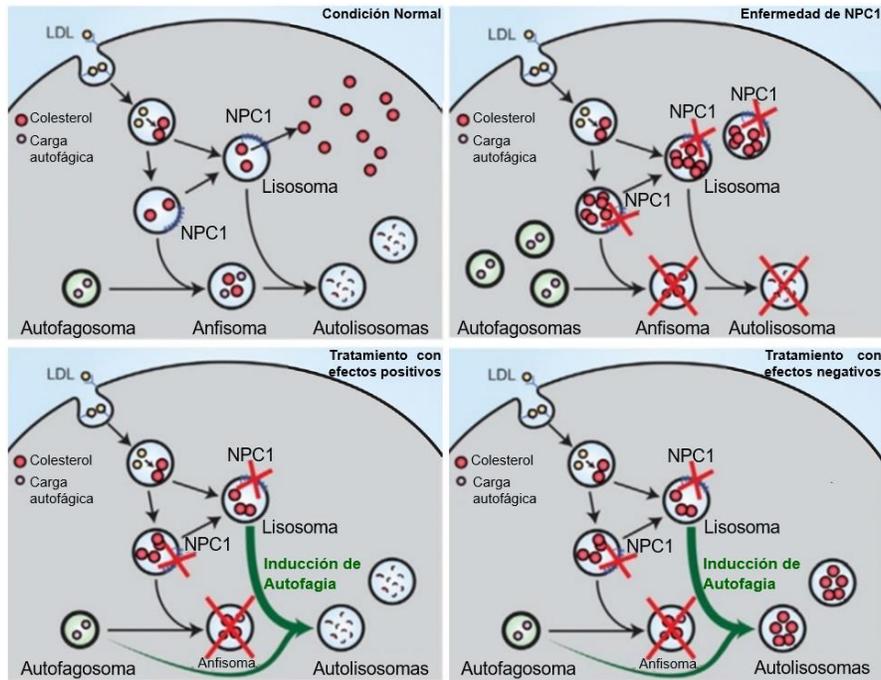


Figura 30. Vías celulares de autofagia que podrían verse afectadas por Rapa en NPC. En condiciones normales, el colesterol se almacena en los lisosomas a través de endocitosis mediada por receptores de LDL y puede ser degradado por la autofagia. Sin embargo, en células con la enfermedad de NPC, el colesterol no puede ser liberado de los lisosomas, lo que interrumpe el flujo autofágico. La inducción de la autofagia en células con NPC, por ejemplo, mediante el tratamiento con Rapa, puede tener dos posibles efectos. Por un lado, se puede reestablecer el flujo autofágico y permitir la degradación de las cargas lisosomales incluyendo el exceso de colesterol (efecto positivo) o pese a la inducción de la autofagia exista una degradación deficiente de las cargas lisosomales, por ende, el flujo autofágico no sea capaz de eliminar el exceso de colesterol no esterificado (efecto negativo). En el último caso, se favorece la acumulación de autolisosomas y aumenta la toxicidad celular. Figura modificada de Maetzel y colaboradores (Maetzel et al., 2014).

Equilibrio entre fisión y fusión de vacuolas en la enfermedad de NPC y su modulación por Rapa

La capacidad para responder a cambios del entorno es una propiedad fundamental de los seres vivos, incluso a nivel celular. El balance entre los procesos de fusión y fisión de membranas tiene un impacto en el volumen y el número de copias de los organelos (Michaillat & Mayer, 2013). Tanto las vacuolas como los lisosomas pueden someterse a ciclos regulados de fisión y fusión. Estos organelos participan en la osmorregulación y el almacenamiento de aminoácidos e iones (Michaillat & Mayer, 2013; Stauffer & Powers, 2015).

En *S. cerevisiae* las vacuolas están influenciadas por las condiciones del medioambiente, como la disponibilidad de nutrientes y la fase de crecimiento. La falta de alimento y nutrientes, por ejemplo, inactiva TORC1, complejo necesario para la fragmentación de las vacuolas, debido a la inducción de estrés al retículo endoplasmático (Stauffer & Powers, 2015). Probablemente debido a este fenómeno es que al utilizar la combinación Rapa-U18 se observó una disminución en la fragmentación de las vacuolas (menor proporción del fenotipo C), en comparación que con solo U18 (Figura 21). Además, se apreció un efecto diferencial entre las cepas, donde la cepa WE mostró un 74,69% de fenotipo C en la condición de U18, mientras que en la condición de Rapa-U18 disminuyó a un 18,12%. En contraste, la cepa WA mostró un 30,01% de fenotipo C en la condición de U18 y un 21,51% en la condición de Rapa-U18. Esto indica que Rapa logra revertir los efectos de U18 en este fenotipo vacuolar, siendo la cepa WE la más afectada con una mayor disminución en la proporción del fenotipo C, lo que es congruente entre los rasgos analizados (μ Máx y fenotipo vacuolar).

Los efectos observados con los diferentes tratamientos se deben, probablemente, a que la modificación del contenido de lípidos vacuolares desempeña un papel importante en la fragmentación de este organelo. Por ejemplo, la acumulación de colesterol puede resultar en lisosomas agrandados, con defectos morfológicos en el tráfico celular y en su funcionalidad. En estudios previos se ha demostrado que la pérdida de función de NPC1, conduce a la acumulación de colesterol en las células y estimula la actividad de mTORC1 en cultivos celulares (Davis et al., 2021).

Por otra parte, los fenotipos vacuolares cuantificados fueron congruentes con las cantidades de ergosterol apreciadas a través de los CTCF, sugiriendo que la acumulación de ergosterol está asociada con la fragmentación de las vacuolas, lo que es evidenciado por el aumento de la frecuencia de los fenotipos vacuolares B y C.

En las cepas parentales tratadas con U18 se observaron mayores cantidades de ergosterol (Figura 24), lo cual se tradujo en una mayor fragmentación vacuolar, indicando probablemente un desplazamiento del equilibrio hacia la fisión vacuolar. Además, se observó una disminución del ergosterol bajo la combinación de Rapa-U18 (Figura 24), congruente con una menor fragmentación vacuolar, sugiriendo que la inhibición de TORC1 por parte de Rapa podría estar implicada en este efecto. Debido a que las vías reguladas por TORC1 inducen la fragmentación vacuolar (Facchinetti et al., 2008; Hosios et al., 2022; Luo et al., 2018; Zhou et al., 2009) y el uso de Rapa disminuye este proceso en *S. cerevisiae*. Además, existen factores que pueden cambiar el grado de estos efectos, entre los cuales podrían ser las variantes presentes en los potenciales genes moduladores identificados en las cepas parentales (Tabla 3).

AVO2 y STV1: posibles genes moduladores de la respuesta a Rapa con respecto a U18

S. cerevisiae ofrece varias ventajas para su uso en la identificación de variantes mediante mapeo genético por ligamiento, específicamente el mapeo por QTL utilizado en esta investigación. Una de estas ventajas es la disponibilidad de diversas plataformas con diferentes *backgrounds* genéticos de *S. cerevisiae* (Liti & Louis, 2012), las que ya han sido genotipificadas, tal como el panel SGRP-4X que fue utilizado en este trabajo. Esto facilita el proceso y reduce costos y tiempo de trabajo (Ho et al., 2021).

El mapeo de QTL se basa en la alta tasa de recombinación meiótica de *S. cerevisiae*, con un promedio de aproximadamente 90 intercambios por meiosis, lo que permite una fenotipificación cuantitativa precisa. Además, posee menos complejidad genética que otros organismos como las moscas y los roedores, lo que facilita el estudio del efecto de un solo gen, debido a la reducción de la redundancia genética (Ho et al., 2021; Olgún et al., 2022). Sin embargo, la identificación de genes moduladores de patologías humanas a través de este modelo tiene limitaciones. Aunque dos tercios de todos los genes de *S. cerevisiae*

comparten al menos un dominio de homología significativa con los genes humanos y aproximadamente el 30% de los genes conocidos involucrados en enfermedades humanas tienen ortólogos en *S. cerevisiae* (Olguín et al., 2022; Smith & Snyder, 2006), existe la posibilidad de identificar genes sin ortólogos humanos o que no posean ortólogos funcionales. Por lo tanto, los resultados deben validarse a través de estudios funcionales.

Por esta razón, para seleccionar potenciales genes moduladores de la respuesta a Rapa con respecto a U18, se utilizaron diferentes criterios de priorización (Figura 28). De los 38 genes cercanos al pico significativo resultante del mapeo de QTL con respecto al rasgo $\mu\text{Máx Rapa-U18} / \mu\text{Máx U18}$ (Figura 28), se destacó la identificación de variantes no sinónimas entre los ortólogos de *S. cerevisiae* y ratón (entre las cepas C57BL/6J y FVB/NJ). Esto permitió priorizar 9 genes. Estas etapas de selección permiten disminuir el número de genes a validar experimentalmente y aumentar su relevancia potencial en mamíferos.

Entre los potenciales genes moduladores encontrados, se identificó *AVO2*, que codifica a una subunidad no esencial de TORC2 en *S. cerevisiae*. Estudios previos han demostrado que TORC2 puede ser inhibido con tratamientos crónicos de Rapa (Schreiber et al., 2015). *AVO2* podría modular los efectos de la inhibición de TORC2, convirtiéndolo en el principal candidato a gen modulador de la respuesta a Rapa. Más aún, el ortólogo humano de *AVO2* es *CTTNBP2*, con identidad de secuencia de 29,87%. Ambas cumplen la función de regular la estructura del citoesqueleto de actina (Chen & Hsueh, 2012; Wullschleger et al., 2005).

La regulación del citoesqueleto de actina puede influir fuertemente en propiedades biofísicas de la membrana celular. Es más, la cantidad de colesterol presente en las membranas regula su adhesión del citoesqueleto de actina, el cual puede impactar sobre la sinapsis y plasticidad neuronal (Gordon-Weeks & Fournier, 2014).

AVO2 puede actuar como una proteína adaptadora para *SLM1* y *SLM2*, sustratos de TORC2, involucrados en la regulación del citoesqueleto de actina (Figura 31) (Wullschleger et al., 2005).

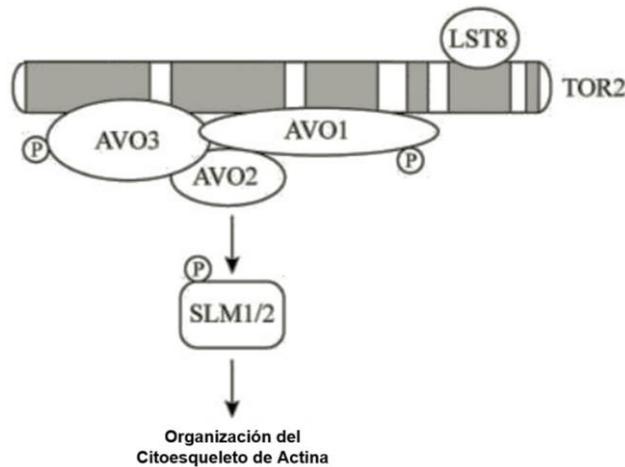


Figura 31. Modelo molecular de TORC2 en *S. cerevisiae*. AVO1 y AVO3 se unen cooperativamente a TOR2 y median la unión de AVO2 al complejo. AVO2 es una proteína periférica, que actúa como proteína adaptadora para sustratos de TORC2, tales como SLM1 y SLM2, las que transmiten señales al citoesqueleto de actina para su organización. Además, LST8 se une a la región del dominio quinasa C-terminal en TOR2 y modula la actividad quinasa intrínseca de TOR2. TORC2 autofosforila sitios en AVO1 y AVO3, para su autorregulación. Figura modificada de Wullschleger y colaboradores (Wullschleger et al., 2005).

CTTNBP2 a diferencia de AVO2, no corresponde a una subunidad de mTORC2, pero interactúa directamente con este complejo a través de Rictor. Está altamente expresada en el cerebro y también regula al citoesqueleto de actina y a proteínas sinápticas que controlan la formación y el mantenimiento de las espinas dendríticas (Chen & Hsueh, 2012).

Además, se ha observado que mutaciones de pérdida de función en CTTNBP2 están relacionadas con una forma grave y familiar del trastorno del espectro autista (TEA), que se encuentra dentro del rango de manifestaciones clínicas de NPC (Ishibashi et al., 2009). Se han identificado 38 mutaciones en el gen *CTTNBP2* en pacientes con TEA (Shih et al., 2020). Esto sugiere que la severidad de esta enfermedad podría estar relacionada con la vía de la autofagia y la regulación del citoesqueleto.

Por otra parte, entre los potenciales genes moduladores encontrados, también se identificó *STV1*, que codifica a la subunidad del dominio vacuolar ATPasa V0, responsable de la acidificación vacuolar mediante su actividad transportadora de protones (Manolson et al., 1994).

STV1 posee diversos ortólogos humanos que codifican proteínas que cumplen su misma función, donde destacan *ATP6V0A4* y *TCIRG1*, con identidad de secuencia del 35,96% y 36,36%, respectivamente. El gen *ATP6V0A4* codifica para la subunidad ATPasa vacuolar transportadora de H⁺ V0 a4 (*ATP6V0A4*), mientras que el gen *TCIRG1* codifica para la subunidad del regulador inmune de células T1, ATPasa transportadora de H⁺ V0 A3 (*TCIRG1*). Las ATPasas vacuolares (V-ATPasas) son bombas de protones rotativas, compuestas por multi-subunidades. Son altamente conservadas a lo largo de la evolución y desempeñan un papel crucial en la regulación del pH de las células y sus compartimentos intracelulares. Las V-ATPasas de la membrana plasmática se encuentran en la superficie de algunas células especializadas, como osteoclastos, células intercaladas del riñón y células cancerosas metastásicas, donde secretan protones a través de las membranas al líquido extracelular. *ATP6V0A4* se encuentra en las membranas plasmáticas en algunas células especializadas (Esmail et al., 2018; Shinwari et al., 2022). Este proceso influye en la mayoría de las hidrolasas lisosomales, así como en varias funciones adicionales de señalización que se atribuyen a los lisosomas, como la detección y regulación de la homeostasis de nutrientes. Además, la interacción proteína-proteína entre NPC1 y NPC2, para el transporte de colesterol no esterificado, solo ocurre a pH ácido, similar al del lumen de endosomas tardíos o lisosomas (Colacurcio & Nixon, 2016; Vance & Karten, 2014).

Las mutaciones de pérdida de función en el gen *ATP6V0A4* pueden causar acidosis tubular renal distal autosómica recesiva, un trastorno grave del equilibrio ácido-base que a menudo se acompaña de sordera neurosensorial (Norgett et al., 2012; Stover et al., 2002).

Por otro lado, las mutaciones en el gen *TCIRG1* se han relacionado con osteopetrosis autosómica recesiva y neutropenia congénita grave. Más de la mitad de todos los pacientes con osteopetrosis autosómica recesiva tenían mutaciones en *TCIRG1*. La proteína *TCIRG1* juega un papel crucial en la formación del sistema linfático. Ayuda a que los linfangioblastos inmaduros crezcan y migren, formando finalmente el revestimiento epitelial de los canales linfáticos (Shinwari et al., 2022).

Así, se puede apreciar la existencia de diversos factores que posicionan tanto a *AVO2* y *STV1* en *S. cerevisiae* como a sus ortólogos humanos, como posibles moduladores de la respuesta a Rapa, en comparación con los otros candidatos.

La validación de estos genes como moduladores de la respuesta a Rapa puede ser realizada mediante estudios funcionales, los que podrían ser con la utilización de cepas

deletantes (mutantes nulas) de *S. cerevisiae* para los genes identificados y/o las mismas cepas parentales utilizadas en este trabajo modificadas con CRISPR, para determinar cómo afecta la ausencia de cada gen seleccionado o bien las variantes identificadas en estos genes, a la respuesta de Rapa con respecto a U18, sobre los parámetros de $\mu_{M\acute{a}x}$ en primera instancia. Por ejemplo, determinar si la ausencia de algún gen o variante logra revertir la susceptibilidad de WA a la combinación Rapa-U18.

Se espera que este conocimiento contribuya a predecir el efecto de Rapa en diferentes pacientes, representando un avance hacia la aplicación de la medicina de precisión en el tratamiento de la enfermedad de NPC.

Conclusiones

- En este estudio se logró identificar la concentración de 0,25 nM de Rapa, como la menor concentración con un efecto diferencial sobre las curvas de crecimiento de las cepas WA, SA, NA y WE tratadas con U18.
- El tratamiento con Rapa revirtió la disgregación vacuolar inducida por U18, dado por la disminución del porcentaje de los fenotipos B y C en las cepas SA, NA y WE.
- El estudio de ligamiento identificó potenciales genes moduladores de la respuesta a Rapa en NPC, de los cuales, después de la utilización de criterios de priorización, destacaron *AVO2* y *STV1*.
- Estos hallazgos aprueban la hipótesis planteada en este trabajo.

Proyecciones

La validación de los genes moduladores identificados, así como de sus ortólogos humanos mediante estudios funcionales, puede ayudar a comprender el papel que desempeñan en la respuesta a Rapa y en la enfermedad de NPC, aumentar la comprensión de la variabilidad de esta patología, llevar a la identificación de nuevos blancos farmacológicos y permitir el avance de la medicina de precisión.

Referencias:

- Alavi, A., Nafissi, S., Shamshiri, H., Nejad, M. M., & Elahi, E. (2013). Identification of mutation in NPC2 by exome sequencing results in diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110.
- Amritraj, A., Wang, Y., Revett, T. J., Vergote, D., Westaway, D., & Kar, S. (2013). Role of cathepsin D in U18-induced neuronal cell death: Potential implication in Niemann-Pick type C disease pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(5).
- Ba, L., Li, Z. jun, Bu, B. tao, Wang, W., & Zhang, M. (2017). Aberrant activation of Cdc2/cyclin B1 is involved in initiation of cytoskeletal pathology in murine Niemann-Pick disease type C. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 37(5).
- Baxter, L. L., Watkins-Chow, D. E., Johnson, N. L., Farhat, N. Y., Platt, F. M., Dale, R. K., Porter, F. D., Pavan, W. J., & Rodriguez-Gil, J. L. (2022). Correlation of age of onset and clinical severity in Niemann–Pick disease type C1 with lysosomal abnormalities and gene expression. *Scientific Reports* 2022, 12(1).
- Berger, A. C., Hanson, P. K., Nichols, J. W., & Corbett, A. H. (2005). A yeast model system for functional analysis of the Niemann-Pick type C protein 1 homolog, Ncr1p. *Traffic*, 6(10).
- Bianconi, S. E., Hammond, D. I., Farhat, N. Y., Dang Do, A., Jenkins, K., Cougnoux, A., Martin, K., & Porter, F. D. (2019). Evaluation of age of death in Niemann-Pick disease, type C: Utility of disease support group websites to understand natural history. *Molecular Genetics and Metabolism*, 126(4).
- Brett, C. L., Kallay, L., Hua, Z., Green, R., Chyou, A., Zhang, Y., Graham, T. R., Donowitz, M., & Rao, R. (2011). Genome-wide analysis reveals the vacuolar pH-stat of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 6(3), e17619.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483).
- Bu, B., Li, J., Davies, P., & Vincent, I. (2002). Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15).
- Calderón, J. F., & Klein, A. D. (2018). Controversies on the potential therapeutic use of rapamycin for treating a lysosomal cholesterol storage disease. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 15.
- Cenedella, R. J. (1983). Source of cholesterol for the ocular lens, studied with U18: A cataract-producing inhibitor of lipid metabolism. *Experimental Eye Research*, 37(1).

- Cermak, S., Kosicek, M., Mladenovic-Djordjevic, A., Smiljanic, K., Kanazir, S., & Hecimovic, S. (2016). Loss of Cathepsin B and L Leads to Lysosomal Dysfunction, NPC-Like Cholesterol Sequestration and Accumulation of the Key Alzheimer's Proteins. *PLoS one*, 11(11).
- Cervelli, T., & Galli, A. (2021). Yeast as a Tool to Understand the Significance of Human Disease-Associated Gene Variants. *Genes*, 12(9), 1303.
- Chen, Y. K., & Hsueh, Y. P. (2012). Cortactin-binding protein 2 modulates the mobility of cortactin and regulates dendritic spine formation and maintenance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(3).
- Colacurcio, D. J., & Nixon, R. A. (2016). Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Research Reviews*, 32.
- Contreras, P. S., Gonzalez-Zuñiga, M., González-Hódar, L., Yáñez, M. J., Dulcey, A., Marugan, J., Seto, E., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2016). Neuronal gene repression in Niemann-Pick type C models is mediated by the c-Abl/HDAC2 signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(2).
- Cruz, J. C., Sugii, S., Yu, C., & Chang, T. Y. (2000). Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6).
- Cubillos, F. A., Billi, E., Zörgö, E., Parts, L., Fargier, P., Omholt, S., Blomberg, A., Warringer, J., Louis, E. J., & Liti, G. (2011). Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Molecular Ecology*, 20(7).
- Cubillos, F. A., Louis, E. J., & Liti, G. (2009). Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Research*, 9(8).
- Cubillos, F. A., Parts, L., Salinas, F., Bergström, A., Scovacicchi, E., Zia, A., Illingworth, C. J. R., Mustonen, V., Ibstedt, S., Warringer, J., Louis, E. J., Durbin, R., & Liti, G. (2013). High-resolution mapping of complex traits with a four-parent advanced intercross yeast population. *Genetics*, 195(3).
- Cubillos, F., Brice, C., Molinet, J., Tisé, S., Abarca, V., Tapia, S., Oporto, C., García, V., Liti, G., & Martínez, C. (2017). Identification of Nitrogen Consumption Genetic Variants in Yeast Through QTL Mapping and Bulk Segregant RNA-Seq Analyses. *G3*, 7(6).
- Davis, O. B., Shin, H. R., Lim, C. Y., Wu, E. Y., Kukurugya, M., Maher, C. F., Perera, R. M., Ordonez, M. P., & Zoncu, R. (2021). NPC1-mTORC1 Signaling Couples Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C. *Developmental Cell*, 56(3).

- Elrick, M. J., Yu, T., Chung, C., & Lieberman, A. P. (2012). Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease. *Human Molecular Genetics*, 21(22).
- Esmail, S., Kartner, N., Yao, Y., Kim, J. W., Reithmeier, R. A. F., & Manolson, M. F. (2018). Molecular mechanisms of cutis laxa- and distal renal tubular acidosis-causing mutations in V-ATPase a subunits, ATP6V0A2 and ATP6V0A4. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(8).
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., & Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO Journal*, 27(14).
- Frankl, A., Mari, M., & Reggiori, F. (2015). Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 2(11).
- Garver, W. S., Jelinek, D., Meaney, F. J., Flynn, J., Pettit, K. M., Shepherd, G., Heidenreich, R. A., Walsh Vockley, C. M., Castro, G., & Francis, G. A. (2010). The national niemann-pick type c1 disease database: Correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *Journal of Lipid Research*, 51(2).
- Garvera, W. S., Krishnana, K., Gallagosa, J. R., Michikawab, M., Francisc, G. A., & Heidenreicha, R. A. (2002). Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae. *Journal of Lipid Research*, 43(4).
- Geberhiwot, T., Moro, A., Dardis, A., Ramaswami, U., Sirrs, S., Marfa, M. P., Vanier, M. T., Walterfang, M., Bolton, S., Dawson, C., Héron, B., Stampfer, M., Imrie, J., Hendriksz, C., Gissen, P., Crushell, E., Coll, M. J., Nadjar, Y., Klünemann, H., ... International Niemann-Pick Disease Registry (INPDR). (2018). Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 50.
- Gordon-Weeks, P. R., & Fournier, A. E. (2014). Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. *Journal of Neurochemistry*, 129(2).
- Grubb, S. C., Churchill, G. A., & Bogue, M. A. (2004). A collaborative database of inbred mouse strain characteristics. *Bioinformatics*, 20(16).
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1).
- Hamilton, B. A., & Yu, B. D. (2012). Modulator genes and the plasticity of genetic networks in mice. *PLoS genetics*, 8(4), e1002644.
- Higaki, K., Ninomiya, H., Sugimoto, Y., Suzuki, T., Taniguchi, M., Niwa, H., Pentchev, P. G., Vanier, M. T., & Ohno, K. (2001). Isolation of NPC1-deficient Chinese hamster ovary cell mutants by gene trap mutagenesis. *Journal of Biochemistry*, 129(6).

- Higgins, M. E., Davies, J. P., Chen, F. W., & Ioannou, Y. A. (1999). Niemann–Pick C1 Is a Late Endosome-Resident Protein That Transiently Associates with Lysosomes and the Trans-Golgi Network. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(1).
- Ho, P. W., Piampongsant, S., Gallone, B., Del Cortona, A., Peeters, P. J., Reijbroek, F., Verbaet, J., Herrera, B., Cortebeek, J., Nolmans, R., Saels, V., Steensels, J., Jarosz, D. F., & Verstrepen, K. J. (2021). Massive QTL analysis identifies pleiotropic genetic determinants for stress resistance, aroma formation, and ethanol, glycerol and isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 211.
- Höglinger, D., Burgoyne, T., Sanchez-Heras, E., Hartwig, P., Colaco, A., Newton, J., Futter, C. E., Spiegel, S., Platt, F. M., & Eden, E. R. (2019). NPC1 regulates ER contacts with endocytic organelles to mediate cholesterol egress. *Nature communications*, 10(1), 4276.
- Hosios, A. M., Wilkinson, M. E., McNamara, M. C., Kalafut, K. C., Torrence, M. E., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2022). MTORC1 regulates a lysosome-dependent adaptive shift in intracellular lipid species. *Nature Metabolism*, 4(12).
- Infante, R. E., Wang, M. L., Radhakrishnan, A., Kwon, H. J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40).
- Ishibashi, S., Yamazaki, T., & Okamoto, K. (2009). Association of autophagy with cholesterol-accumulated compartments in Niemann-Pick disease type C cells. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(7).
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüeegg, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6(11).
- Jin, Y., Jin, N., Oikawa, Y., Benyair, R., Koizumi, M., Wilson, T. E., Ohsumi, Y., & Weisman, L. S. (2022). Bur1 functions with TORC1 for vacuole-mediated cell cycle progression. *EMBO Reports*, 23(4), e53477.
- Karten, B., Vance, D. E., Campenot, R. B., & Vance, J. E. (2003). Trafficking of cholesterol from cell bodies to distal axons in Niemann Pick C1-deficient neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(6).
- Klein, A. D., Alvarez, A., & Zanolungo, S. (2014). The unique case of the Niemann-Pick type C cholesterol storage disorder. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 12 Suppl 1.
- Klein, A. D., Oyarzún, J. E., Cortez, C., & Zanolungo, S. (2018). Gadolinium Chloride Rescues Niemann–Pick Type C Liver Damage. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3599.

- Klein, A., Maldonado, C., Vargas, L. M., Gonzalez, M., Robledo, F., Arce, K., Muñoz, F. J., Hetz, C., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2011). Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Neurobiology of Disease*, 41(1).
- Ko, D. C., Binkley, J., Sidow, A., & Scott, M. P. (2003). The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5).
- Kosorok, M. R., & Laber, E. B. (2019). Precision Medicine. *Annual Review of Statistics and Its Application*, 6(1).
- Krobitsch, S., & Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4).
- Kuo, C. J., Chung, J., Fiorentino, D. F., Flanagan, W. M., Blenis, J., & Crabtree, G. R. (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature*, 358(6381).
- Lee, M., Rowell, W. J., Menafra, R., Guchelaar, H. J., Swen, J. J., & Anvar, S. Y. (2022). Application of long-read sequencing to elucidate complex pharmacogenomic regions: A proof of principle. *The pharmacogenomics journal*, 22(1).
- Lee, S. Y., Lee, H. J., Kim, S. H., Jeong, Y. J., Jin, H. K., Bae, J. S., Cheon, S. M., & Kim, J. W. (2016). Two Siblings with Adolescent/Adult Onset Niemann-Pick Disease Type C in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 31(7).
- Li, S. C., & Kane, P. M. (2009). The Yeast Lysosome-like Vacuole: Endpoint and Crossroads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(4).
- Li, X., Saha, P., Li, J., Blobel, G., & Pfeffer, S. R. (2016). Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle luminal domain bound to NPC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(36).
- Liedtke, M., Völkner, C., Hermann, A., & Frech, M. J. (2022). Impact of Organelle Transport Deficits on Mitophagy and Autophagy in Niemann-Pick Disease Type C. *Cells*, 11(3), 507.
- Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., Oudenaarden, A., Barton, D. B. H., Bailes, E., Nguyen, A. N., Jones, M., & Louis, E. J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 458(7236).
- Liti, G., & Louis, E. J. (2012). Advances in quantitative trait analysis in yeast. *PLoS genetics*, 8(8), e1002912.

- Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A., & Platt, F. M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine*, *14*(11).
- Long, T., Hassan, A., Thompson, B. M., McDonald, J. G., Wang, J., & Li, X. (2019). Structural basis for human sterol isomerase in cholesterol biosynthesis and multidrug recognition. *Nature communications*, *10*(1), 2452.
- Lu, F., Liang, Q., Abi-Mosleh, L., Das, A., Brabander, J. K., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2015). Identification of NPC1 as the target of U18, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *ELife*, *4*, e12177.
- Luo, Y., Xu, W., Li, G., & Cui, W. (2018). Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 7838647.
- Maetzel, D., Sarkar, S., Wang, H., Abi-Mosleh, L., Xu, P., Cheng, A. W., Gao, Q., Mitalipova, M., & Jaenisch, R. (2014). Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from niemann-pick type C patient-specific iPS cells. *Stem Cell Reports*, *2*(6).
- Malathi, K., Higaki, K., Tinkelenberg, A. H., Balderes, D. A., Almanzar-Paramio, D., Wilcox, L. J., Erdeniz, N., Redican, F., Padamsee, M., Liu, Y., Khan, S., Alcantara, F., Carstea, E. D., Morris, J. A., & Sturley, S. L. (2004). Mutagenesis of the putative sterol-sensing domain of yeast Niemann Pick C-related protein reveals a primordial role in subcellular sphingolipid distribution. *Journal of Cell Biology*, *164*(4).
- Manolson, M. F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A., & Jones, E. W. (1994). STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(19).
- März, A. M., Fabian, A.-K., Kozany, C., Bracher, A., & Hausch, F. (2013). Large FK506-binding proteins shape the pharmacology of rapamycin. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(7).
- Maubert, A., Hanon, C., & Metton, J. P. (2015). Niemann-Pick type C disease and psychosis: Two siblings. *L'Encephale*, *41*(3).
- Mengel, E., Pineda, M., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Torres, J. v., & Kolb, S. A. (2017). Differences in Niemann-Pick disease Type C symptomatology observed in patients of different ages. *Molecular Genetics and Metabolism*, *120*(3).
- Menon, M. B., & Dhamija, S. (2018). Beclin 1 Phosphorylation - at the Center of Autophagy Regulation. *Frontiers in cell and developmental biology*, *6*, 137.
- Meske, V., Erz, J., Priesnitz, T., & Ohm, T. G. (2014). The autophagic defect in Niemann-Pick disease type C neurons differs from somatic cells and reduces neuronal viability. *Neurobiology of Disease*, *64*.

- Michaillat, L., & Mayer, A. (2013). Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one*, 8(2), e54160.
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001). Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Research*, 11(5).
- Norgett, E. E., Golder, Z. J., Lorente-Cánovas, B., Ingham, N., Steel, K. P., & Karet Frankl, F. E. (2012). Atp6v0a4 knockout mouse is a model of distal renal tubular acidosis with hearing loss, with additional extrarenal phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34).
- Ohgami, N., Kot, D. C., Thomas, M., Scott, M. P., Chang, C. C. Y., & Chang, T. Y. (2004). Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34).
- Olguín, V., Durán, A., Las Heras, M., Rubilar, J. C., Cubillos, F. A., Olguín, P., & Klein, A. D. (2022). Genetic Background Matters: Population-Based Studies in Model Organisms for Translational Research. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 7570.
- Pacheco, C. D., Kunkel, R., & Lieberman, A. P. (2007). Autophagy in Niemann–Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects. *Human Molecular Genetics*, 16(12).
- Parenti, G., Andria, G., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: From pathophysiology to therapy. *Annual Review of Medicine*, 66.
- Pearce, D. A., & Sherman, F. (1998). A yeast model for the study of Batten disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12).
- Platt, F. M., d'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., & Tiffet, C. J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 27.
- Powers, T. (2007). TOR signaling and S6 kinase 1: Yeast catches up. *Cell Metabolism*, 6(1).
- Proszynski, T. J., Klemm, R. W., Gravert, M., Hsu, P. P., Gloor, Y., Wagner, J., Kozak, K., Grabner, H., Walzer, K., Bagnat, M., Simons, K., & Walch-Solimena, C. (2005). A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50).
- Rahit, K. M. T. H., & Tarailo-Graovac, M. (2020). Genetic Modulators and Rare Mendelian Disease. *Genes*, 11(3), 239.
- Rintoul, D. A., Cundy, K. V., & Cenedella, R. J. (1987). Physical properties of membranes and membrane lipids from the fiber cell of the U18-cataractous rat. *Current Eye Research*, 6(11).

- Riordan, J. D., & Nadeau, J. H. (2017). From Peas to Disease: Modulator Genes, Network Resilience, and the Genetics of Health. *American Journal of Human Genetics*, 101(2).
- Roff, C. F., Goldin, E., Comly, M. E., Cooney, A., Brown, A., Vanier, M. T., Miller, S. P. F., Brady, R. O., & Pentchev, P. G. (1991). Type C Niemann-Pick Disease: Use of Hydrophobic Amines to Study Defective Cholesterol Transport. *Developmental Neuroscience*, 13(4–5).
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1).
- Sarkar, S., Carroll, B., Buganim, Y., Maetzel, D., Ng, A. H. M., Cassady, J. P., Cohen, M. A., Chakraborty, S., Wang, H., Spooner, E., Ploegh, H., Gsponer, J., Korolchuk, V. I., & Jaenisch, R. (2013). Impaired autophagy in the lipid storage disorder Niemann–Pick type C1 disease. *Cell Reports*, 5(5).
- Schreiber, K. H., Ortiz, D., Academia, E. C., Anies, A. C., Liao, C. Y., & Kennedy, B. K. (2015). Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell*, 14(2).
- Seeley, E. S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W., & Eitzen, G. (2002). Genomic Analysis of Homotypic Vacuole Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3).
- Shih, P. Y., Hsieh, B. Y., Tsai, C. Y., Lo, C. A., Chen, B. E., & Hsueh, Y. P. (2020). Autism-linked mutations of CTTNBP2 reduce social interaction and impair dendritic spine formation via diverse mechanisms. *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 185.
- Shinwari, K., Rehman, H. M., Liu, G., Bolkov, M. A., Tuzankina, I. A., & Chereshev, V. A. (2022). Novel Disease-Associated Missense Single-Nucleotide Polymorphisms Variants Predication by Algorithms Tools and Molecular Dynamics Simulation of Human TCIRG1 Gene Causing Congenital Neutropenia and Osteopetrosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 879875.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242).
- Smith, M. G., & Snyder, M. (2006). Yeast as a Model for Human Disease. *Current Protocols in Human Genetics*, 48.
- Stauffer, B., & Powers, T. (2015). Target of rapamycin signaling mediates vacuolar fission caused by endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 26(25).
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., Chu, A. M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P. J., & Davis, R. W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nature genetics*, 31(4).

- Stirling, P. C., Bloom, M. S., Solanki-Patil, T., Smith, S., Sipahimalani, P., Li, Z., Kofoed, M., Ben-Aroya, S., Myung, K., & Hieter, P. (2011). The complete spectrum of yeast chromosome instability genes identifies candidate CIN cancer genes and functional roles for ASTRA complex components. *PLoS genetics*, 7(4), e1002057.
- Storey, J. D., Akey, J. M., & Kruglyak, L. (2005). Multiple locus linkage analysis of genomewide expression in yeast. *PLoS biology*, 3(8), e267.
- Stover, E. H., Akil, I., Al-Sabban, E. A., Baguley, D. M., Bianca, S., Bakkaloglu, A., Bircan, Z., Chauveau, D., Clermont, M. J., Guala, A., Hulton, S. A., Borthwick, K. J., Kroes, H., Li Volti, G., Mir, S., Mocan, H., Nayir, A., Ozen, S., Rodriguez Soriano, J., & Axon, P. R. (2002). Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *Journal of Medical Genetics*, 39(11).
- Suzuki, T., Sugiyama, M., Wakazono, K., Kaneko, Y., & Harashima, S. (2012). Lactic acid stress causes vacuolar fragmentation and impairs intracellular amino-acid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(4).
- Tatebe, H., & Shiozaki, K. (2017). Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules*, 7(4), 77.
- Thompson, D. A., & Cubillos, F. A. (2017). Natural gene expression variation studies in yeast. *Yeast*, 34(1).
- Tsuji, T., Fujimoto, M., Tatematsu, T., Cheng, J., Orii, M., Takatori, S., & Fujimoto, T. (2017). Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole. *eLife*, 6, e25960.
- Vance, J. E., & Karten, B. (2014). Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *Journal of Lipid Research*, 55(8).
- Vanier M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet journal of rare diseases*, 5, 16.
- Vázquez, M. C., Martínez, P., Alvarez, A. R., González, M., & Zanlungo, S. (2012). Increased copper levels in in vitro and in vivo models of Niemann-Pick C disease. *BioMetals*, 25(4).
- Vruchte, D., Lloyd-Evans, E., Veldman, R. J., Neville, D. C. A., Dwek, R. A., Platt, F. M., Blitterswijk, W. J., & Sillences, D. J. (2004). Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25).
- Walterfang, M., Fietz, M., Abel, L., Bowman, E., Mocellin, R., & Velakoulis, D. (2009). Gender dimorphism in siblings with schizophrenia-like psychosis due to Niemann-Pick disease type C. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32 Suppl 1.

- Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F. A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J. T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S. W., Louis, E. J., Liti, G., Moses, A., & Blomberg, A. (2011). Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genetics*, 7(6).
- Wheeler, S., Haberkant, P., Bhardwaj, M., Tongue, P., Ferraz, M. J., Halter, D., Sprong, H., Schmid, R., Aerts, J. M. F. G., Sullo, N., & Sillence, D. J. (2019). Cytosolic glucosylceramide regulates endolysosomal function in Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of disease*, 127.
- Winkler, M. B. L., Kidmose, R. T., Szomek, M., Thaysen, K., Rawson, S., Muench, S. P., Wüstner, D., & Pedersen, B. P. (2019). Structural Insight into Eukaryotic Sterol Transport through Niemann-Pick Type C Proteins. *Cell*, 179(2).
- Winkler, M. B. L., Nel, L., Frain, K. M., Dedic, E., Olesen, E., & Pedersen, B. P. (2022). Sterol uptake by the NPC system in eukaryotes: A *Saccharomyces cerevisiae* perspective. *FEBS Letters*, 596(2).
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., & Hall, M. N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35).
- Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells*, 9(7), 1679.
- Yañez, M. J., Marín, T., Balboa, E., Klein, A. D., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2020). Finding pathogenic commonalities between Niemann-Pick type C and other lysosomal storage disorders: Opportunities for shared therapeutic interventions. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(10).
- Zhang, S., Ren, J., Li, H., Zhang, Q., Armstrong, J. S., Munn, A. L., & Yang, H. (2004). Ncr1p, the Yeast Ortholog of Mammalian Niemann Pick C1 Protein, is Dispensable for Endocytic Transport. *Traffic*, 5(12).
- Zhitomirsky, B., Farber, H., & Assaraf, Y. G. (2018). LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(4).
- Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C. H., Zhang, W., Sinton, C., Powell, C. M., & Parada, L. F. (2009). Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(6).