

# Estudio funcional del promotor del gen *NPC1L1*

Beatriz Martín<sup>a</sup>, María Solanas<sup>b</sup>, Sandra Pampín<sup>c</sup>, José-Carlos Rodríguez-Rey<sup>c</sup>, Fernando Civeira<sup>b</sup> y Miguel Pocovi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

<sup>b</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

<sup>c</sup>Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander. España.

---

**Introducción.** En la absorción intestinal de colesterol intervienen distintos transportadores, uno de gran importancia y diana del fármaco ezetimiba, la proteína NPC1L1. Se ha demostrado una asociación entre distintas variantes genéticas de *NPC1L1*, la eficiencia en la absorción de esterolos y la concentración plasmática de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad. El objetivo de este estudio fue identificar y analizar el efecto funcional de los polimorfismos genéticos potencialmente más relevantes del gen *NPC1L1* sobre su actividad transcripcional.

**Material y métodos.** Como zona de estudio se seleccionó 2 kb de la región promotora del gen *NPC1L1*. Se realizó una búsqueda en bases de datos para localizar variantes descritas en las secuencias seleccionadas. Se diseñaron 3 fragmentos, que se amplificaron mediante PCR y posteriormente se secuenciaron. La funcionalidad del polimorfismo -133A>G se determinó mediante ensayos de retardo en gel y medida de la actividad luciférica.

**Resultados.** El análisis de la zona promotora de 102 sujetos normolipidémicos mostró 5 nuevas variantes polimórficas (-1485C>T, -1425C>G, -982G>C, -292T>C y -18C>A) no identificadas

---

Este trabajo recibió una Mención Especial en el XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis celebrado en Valencia en 2007.

Este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Fundación Cuenca Villoro y al proyecto del FIS PI06/1402.

Correspondencia: Dra. B. Martín Aznar.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.  
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.  
Pedro Cerbuna, 12. 50009 Zaragoza. España.  
Correo electrónico: bmartinaznar@gmail.com

Recibido el 26 de marzo de 2008 y aceptado el 15 mayo de 2008.

previamente. Los resultados de los ensayos de retardo en gel con el polimorfismo -133A>G revelaron mayor afinidad de unión de las proteínas nucleares con la sonda portadora de la variante -133A. Por otra parte, la actividad del promotor de *NPC1L1* con la variante -133G mostró un aumento de 2,5 veces respecto a la variante -133A.

**Conclusión.** Nuestros resultados demuestran que hay diferencias en la afinidad de unión y actividad transcripcional de *NPC1L1* en función del polimorfismo -133A>G. Esta variante génica podría contribuir a la variabilidad interindividual de la absorción intestinal de esterolos.

*Palabras clave:*

Absorción intestinal de colesterol. *NPC1L1*. Polimorfismos. Factores de transcripción.

## FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *NPC1L1* GENE PROMOTER

**Introduction.** Cholesterol absorption is a process which involves the participation of numerous transporters. One of these transporters is NPC1L1, identified as a critical protein for intestinal cholesterol absorption and the molecular target of ezetimibe. It has been shown that NPC1L1 variants are associated with variations in sterol absorption and plasma levels of LDL-C. The aim of this work was to identify and analyse the potential functional effect on the transcriptional activity of *NPC1L1* gene polymorphisms.

**Material and methods.** The previously described *NPC1L1* promoter variants were located by means of SNP database search. The *NPC1L1* promoter was analysed by three PCR reactions followed by automatic capillary sequencing. Functional study of the -133A>G polymorphism was performed by EMSA and Luciferase assays.

**Results.** NPC1L1 promoter analysis in 102 normolipemic subjects showed five novel polymorphisms (-1485C>T, -1425C>G, -982G>C, -292T>C y -18C>A). EMSA results revealed that the -133A specific oligonucleotide produced a stronger retarded band than the retarded band corresponding to the -133G allele. Luciferase activity observed with -133G NPC1L1 variant was 2.5-fold higher than that seen with the -133A variant.

**Conclusion.** Our results reveal that the -133A>G polymorphism exerts a significant effect on nuclear extract binding affinity and NPC1L1 transcriptional activity. This gene variant could contribute to interindividual variability of intestinal sterols absorption.

#### Keywords:

Intestinal cholesterol absorption. *NPC1L1*.

Gene polymorphisms. Transcription factors.

## Introducción

La homeostasis de colesterol está regulada a distintos niveles, de tal forma que se establece un equilibrio entre las fuentes de aporte de colesterol, como son la absorción intestinal y la síntesis endógena, y las vías de eliminación, que incluyen principalmente la excreción y, en menor medida, su utilización metabólica<sup>1</sup>. La modificación de alguno de estos procesos puede dar lugar a una alteración patológica en la concentración plasmática de colesterol. La absorción intestinal de colesterol y esteroles de origen vegetal es un proceso complejo, formado por múltiples pasos y en el que intervienen distintas enzimas y transportadores<sup>2</sup>. Dentro de estos transportadores se encuentra la proteína NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*), identificada recientemente por el grupo de Altmann como fundamental en la absorción de colesterol y esteroles vegetales<sup>3,4</sup> y posteriormente diana molecular del inhibidor de absorción intestinal de colesterol ezetimiba<sup>5</sup>. La proteína NPC1L1 pertenece a una familia de proteínas transmembrana en la que está incluida la proteína NPC1<sup>6</sup>, defectuosa en la enfermedad de depósito lisosomal Niemann-Pick tipo C<sup>7</sup> y con la que comparte el 51% de homología en la secuencia de aminoácidos. En humanos, se encuentra normalmente localizada en compartimientos intracelulares, desplazándose a la membrana plasmática del enterocito en función de la disponibilidad de colesterol celular<sup>8,9</sup>.

Diversos estudios<sup>10,11</sup> han demostrado la influencia de variantes genéticas de *NPC1L1* sobre la con-

centración del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) en respuesta a la inhibición de la absorción por ezetimiba. Por otra parte, recientemente se ha observado que hay una asociación entre los polimorfismos de NPC1L1, la variación en la absorción intestinal de esteroles y la concentración plasmática de cLDL en población normolipémica<sup>12</sup>. Por todo ello, nos propusimos como objetivo identificar y analizar el efecto funcional sobre la actividad transcripcional de NPC1L1 de las variantes genéticas localizadas en la zona promotora del gen *NPC1L1*.

## Material y métodos

### Sujetos

El grupo de sujetos que se estudió estuvo constituido por 102 sujetos voluntarios sanos normolipídicos no relacionados, 46 varones y 56 mujeres, con una edad comprendida entre los 25 y los 65 años.

Todos los pacientes aceptaron su inclusión en el estudio previa firma de un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón.

### Estudio genético

Como zona de estudio se seleccionó 2 Kb de la región promotora del gen *NPC1L1*. Se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) para localizar variaciones previamente descritas en la secuencia seleccionada del gen *NPC1L1* obtenida de la base de datos Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), con código de acceso ENSG0000015520. Se diseñaron 3 fragmentos para la determinación de los polimorfismos descritos en estas zonas y de otras posibles variantes no descritas con anterioridad (fig. 1). Los fragmentos se analizaron mediante 3 reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificadas de forma simultánea en un termociclador GeneAmp®9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Las condiciones para la amplificación de los 3 fragmentos fueron: 94 °C 1 min; 35 ciclos (94 °C 15 s-62 °C 15 s-72 °C 50 s); 72 °C 5 min. Los cebadores empleados para la amplificación de la zona promotora del gen *NPC1L1* se diseñaron mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI). Los tamaños de los fragmentos amplificados y los cebadores utilizados se muestran en la tabla 1. La purificación enzimática de los productos amplificados se llevó a cabo con Exo-SAP-IT™ (United States Biochemicals, Cleveland, EE.UU.), y posteriormente se secuenciaron en un secuenciador automático capilar MegaBACE 500 (GE-Healthcare) utilizando el producto comercial DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare).

### Análisis funcional

**Ensayos de retardo en gel o EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).** Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo a partir de extractos nucleares obtenidos de cultivos subconfluentes de la línea celular Caco-2 y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (resaltado en negrita la localización del sitio polimórfico -133A>G): 5'-GGCAGGGCTCAGCCTCATT-3' y 5'-GGCAGGGCTCGGCCTCATT-3'. La preparación de los ex-

**Tabla 1.** Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de la zona promotora del gen *NPC1L1* y tamaño de los fragmentos obtenidos

Fragmento	Nombre	Secuencia	Tamaño fragmento (pb)
1	F1D	5'-GGGGCGAAATCTTCAGGAATGTC-3'	560
	F1R	5'-CTGTGGACCCCTGCCTGATTCAC-3'	
2	F2D	5'-GGGATGACAGTGCAGAGGGTC-3'	646
	F2R	5'-CTGTACCCAGTAACGCTCGC-3'	
3	F3D	5'-CTCAGCCTCTGTCTCTGCATGA-3'	667
	F3R	5'-AGACCCCAGCTCTGCCCTACCC-3'	

tractos nucleares, el marcaje de los oligonucleótidos y las condiciones de la electroforesis se realizaron tal y como se ha descrito previamente<sup>13</sup>. La cuantificación de las bandas de retraso obtenidas se realizó mediante el programa de análisis GS-363 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.). Para la realización del ensayo *supershift*, se empleó 1 µg de anticuerpo RXR- (sc-774X) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.).

**Mantenimiento de las líneas celulares.** Las líneas celulares Hep-G2 (HB-8065<sup>TM</sup>), obtenida a partir de un carcinoma hepatocelular humano, y Caco-2 (HTB-37<sup>TM</sup>), obtenida a partir de un adenocarcinoma colorrectal humano, utilizadas en este trabajo se obtuvieron de la colección ATCC (American Type Culture Collection).

La línea celular Caco-2 se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con Glutamax<sup>TM</sup>-I, 4.500 mg/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato sódico, un 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina-sulfato y un 1% de aminoácidos no esenciales. La línea celular Hep-G2 se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con Glutamax<sup>TM</sup>-I, 4.500 mg/l de D-glucosa, 110 mg/l de piruvato sódico, un 5% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina-sulfato.

Todas las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> con tapón de filtro, en un incubador termostatizado con regulación electrónica de flujo de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, en atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>.

**Clonaje en el vector de expresión pGL3-Basic.** Para clonar la secuencia de la región promotora del gen *NPC1L1*, se amplificó una región que contenía el polimorfismo -133A>G situada entre las posiciones -1.796 y +13 (respecto del origen de transcripción del gen) a partir de ADN de sujetos homocigotos para los 2 genotipos. Los cebadores empleados se diseñaron mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI) tomando como referencia la secuencia ENSG0000015520 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) y fueron los siguientes, directo: 5'-AAAA-AAAAAAAGCTAGCGGACTATCTCTGTGGTGC-3' y reverso: 5'-TTTTTTTTTTAAGCTCCGCCCTCCGCCACCC-CAGGTC-3' que contenían los sitios de restricción NheI y HindIII (subrayados), respectivamente.

Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos, purificados y posteriormente clonados en los sitios NheI y HindIII del vector de expresión pGL3-Basic (Promega, Madison, EE.UU.). La confirmación de la incorporación de las variantes -133A y -133G en cada uno de las construcciones se llevó a cabo mediante secuenciación capilar en un secuenciador MegaBACE 500 (GE-Healthcare). Para el aislamiento y purificación de ADN plasmídico se utilizó el producto comercial HiSpeed<sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

**Ensayos de transfección transitoria y medida de la actividad luciferasa.** Los ensayos de transfección transitoria de las líneas celulares Hep-G2 y Caco-2 se realizaron mediante la técnica de electroporación. Para ello se tomaron 10 × 10<sup>6</sup> de células de los cultivos rutinarios y se resuspendieron en una mezcla compuesta por 500 µl de PBS suplementado con 50 µl de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 10 µg de ADN plasmídico que contenía el promotor del gen *NPC1L1* y 250 ng de ADN del plásmido pRL-TK (Promega, Madison, EE.UU.). Este plásmido se utilizó como control interno de transfección para la normalización de la medida de la actividad luciferasa (ratio luciferasa *photinus/renilla*). Esta mezcla se dispuso en cubetas estériles de electroporación de 4 mm y se electroporó a 975 µF y 300 V en ambas líneas celulares. Tras el pulso eléctrico las células electroporadas se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo completo y se incubaron durante 48 h a 37 °C en atmósfera de O<sub>2</sub> y un 5% de CO<sub>2</sub> hasta la realización de la determinación de la actividad de luciferasa.

Los ensayos para la determinación de la actividad luciferasa se realizaron mediante luminometría, en un luminómetro LB96V (Berthold, Bad Wildbad, Germany) utilizando el producto comercial Dual Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, EE.UU.) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las medidas se integraron y analizaron mediante el software WinGlow v.1.25 (Berthold, Bad Wildbad, Germany).

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa informático Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) v. 12.0 (SPSS Inc. Chicago, EE.UU.). En todos los casos se consideró un nivel de significación estadística de *p* < 0,05. Para cada polimorfismo estudiado se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas. Se comprobó que las frecuencias genotípicas observadas no se desviaban significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de  $\chi^2$ . La comparación de los datos normalizados obtenidos en los ensayos de la actividad luciferasa entre 2 grupos se llevó a cabo mediante la prueba de la *t* de Student.

### Resultados

**Estudio genético de los polimorfismos del promotor del gen *NPC1L1*.** El análisis de la zona promotora llevado a cabo en 102 sujetos normolipémicos mostró la presencia de 5 variantes polimórficas (-1485C>T; -1425C>G; -982G>C; -292T>C, y -18C>A), localizadas a lo largo de toda la zona promotora, no identificadas previamente (fig. 1).

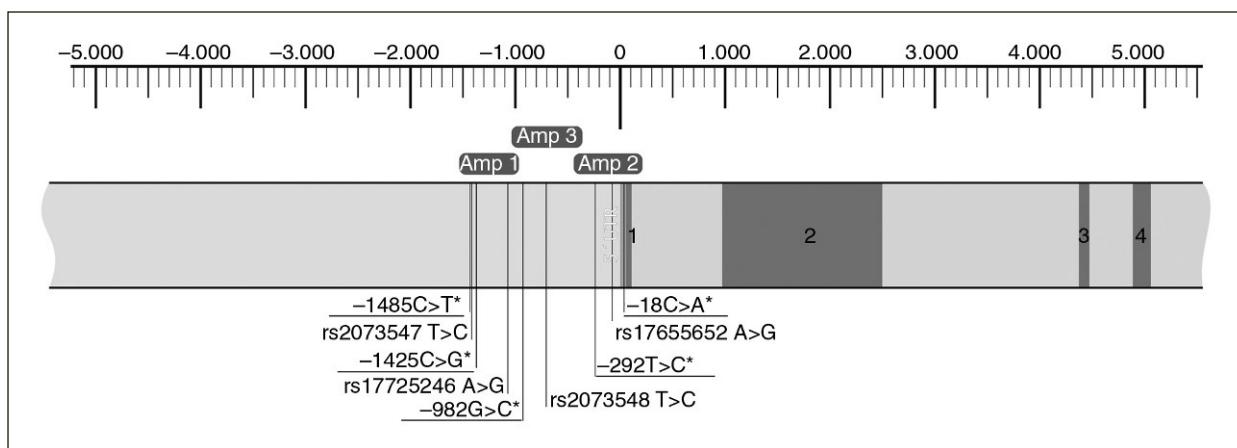


Figura 1. Esquema de amplificación y localización de los polimorfismos descritos previamente e identificados en este estudio. Se muestran los 3 fragmentos diseñados para la amplificación de la zona promotora seleccionada del gen *NPC1L1*. \*Polimorfismos identificados en este estudio.

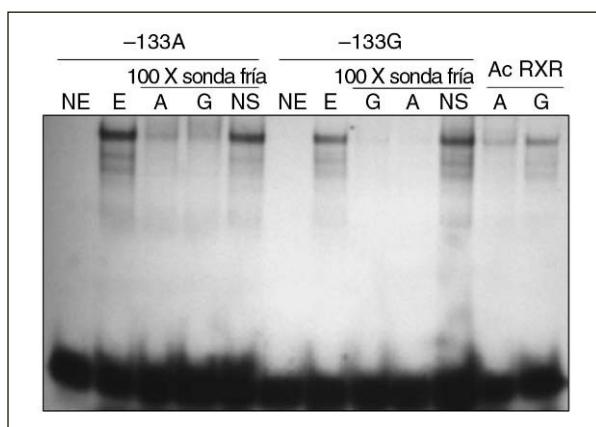


Figura 2. Efecto del polimorfismo -133A>G sobre la afinidad de unión de factores de transcripción. Se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de retardo en gel en presencia de sondas con las 2 variantes del polimorfismo -133A>G. En presencia de las 2 sondas se produjo la formación de complejos retardados con extractos nucleares (E) de la línea celular Caco-2, y fue más intenso el retardo mostrado por la sonda que contenía la variante -133A. NE: no extracto nuclear, utilizado como marcador negativo de retardo; NS: no específico; Ac RXR: en presencia de 1 µg de anticuerpo RXR $\alpha$ .

Todos los polimorfismos analizados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que no habían diferencias significativas entre estas distribuciones y las frecuencias genotípicas esperadas para una población en equilibrio tras la aplicación de la prueba  $\chi^2$ . En la tabla 2 se muestra la distribución alélica y genotípica de los distintos polimorfismos de *NPC1L1* analizados en el grupo de sujetos estudiados.

**Análisis funcional del polimorfismo -133A>G.** Mediante experimentos de retardo en gel o EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) se estudió si la presencia del polimorfismo -133A>G podía afectar a la interacción ADN-proteína. Los ensayos se realizaron a partir de extractos nucleares de la línea celular Caco-2 utilizando oligonucleótidos localizados en la posición -143 a -125 (respecto al origen de transcripción) de la secuencia promotora del gen *NPC1L1*, cada uno de ellos conteniendo la variante -133A o -133G. Los resultados obtenidos mostraron la formación de complejos de las sondas con los extractos nucleares de Caco-2 en presencia de las 2 variantes alélicas del polimorfismo -133A>G. Además, se observó diferente afinidad de unión de las proteínas nucleares en función de la variante alélica presente en la sonda (fig. 2). Los resultados se obtuvieron a partir de 5 experimentos distintos y en todos ellos el oligonucleótido que contenía la variante -133A mostró mayor intensidad ( $1,76 \pm 0,17$ ) en la banda de retardo respecto al oligonucleótido con la variante -133G. Los estudios realizados con herramientas bioinformáticas mostraron que la presencia de esta variante podría alterar la secuencia reconocida por el factor de transcripción RXR. Para comprobar si esto era así, se realizó un ensayo supershift con anticuerpo RXR $\alpha$ . Como se puede observar en la figura 2, en presencia del anticuerpo la banda retardada con la sonda portadora del alelo -133A desaparece, lo que sugiere que RXR $\alpha$  es la proteína que se está uniendo a esta secuencia; por el contrario, no sucede lo mismo con la sonda que contiene la variante -133G.

**Tabla 2. Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos de la zona promotora del gen *NPC1L1* analizados**

Polimorfismos (ENSG0000015520)	Frecuencia genotípica				Frecuencia alélica		EHW P
		n			n		
-1485C>T* (P1-NPC1L1)	CC	97	0,95	C	199	0,97	0,796
	CT	5	0,05	T	5	0,03	
	TT	0	—				
-1473T>C (rs2073547)	TT	63	0,64	T	159	0,8	0,593
	TC	33	0,33	C	39	0,2	
	CC	3	0,03				
-1425C>G* (P2-NPC1L1)	CC	100	0,98	C	202	0,99	0,919
	CG	2	0,02	G	2	0,01	
	GG	0	—				
-1128A>G (rs17725246)	AA	63	0,64	A	159	0,8	0,593
	AG	33	0,33	G	39	0,2	
	GG	3	0,03				
-982G>C* (P5-NPC1L1)	GG	101	0,99	G	203	0,99	0,959
	GC	1	0,01	C	1	0,01	
	CC	0	—				
-762T>C (rs2073548)	TT	98	0,99	T	197	0,99	0,959
	TC	1	0,01	C	1	0,01	
	CC	0	—				
-292T>C* (P3-NPC1L1)	TT	94	0,94	T	194	0,97	0,755
	TC	6	0,06	C	6	0,03	
	CC	0	—				
-133A>G (rs17655652)	AA	55	0,55	A	148	0,74	0,901
	AG	38	0,38	G	52	0,26	
	GG	7	0,07				
-18C>A* (P4-NPC1L1)	CC	65	0,65	C	157	0,78	0,121
	CA	27	0,27	A	43	0,22	
	AA	8	0,08				

EHW: equilibrio de Hardy-Weinberg.

\*Polimorfismos identificados por primera vez en este estudio: P1-NPC1L1; P2-NPC1L1; P3-NPC1L1; P4-NPC1L1; P5-NPC1L1.

Para conocer si el polimorfismo -133A>G afectaba a la actividad transcripcional del promotor del gen *NPC1L1*, se llevaron a cabo experimentos in vitro de transfección transitoria en las líneas celulares Caco-2 y Hep-G2. Las transfecciones de las construcciones con cada una de las variantes del polimorfismo que se debía estudiar, fueron realizadas mediante electroporación. Los plásmidos utilizados fueron obtenidos a partir de 2 preparaciones diferentes y cotransfектados con el plásmido pRL-TK utilizado como control interno de transfección. Además, se realizaron transfecciones en las líneas Caco-2 y Hep-G2 con el plásmido pGL3-Basic, carente de secuencia promotora, que sirvió de control negativo.

Como era de esperar, la actividad luciférica del plásmido pGL3-Basic fue prácticamente insignificante en ambas líneas celulares. La actividad luciférica normalizada de la construcción pGL3 (-133A) que contenía la secuencia promotora con la variante alélica -133A/A se estableció como referencia. Tal y como se muestra en la figura 3, se produjo un incremento de 2,8 y 2,3 veces en la activi-

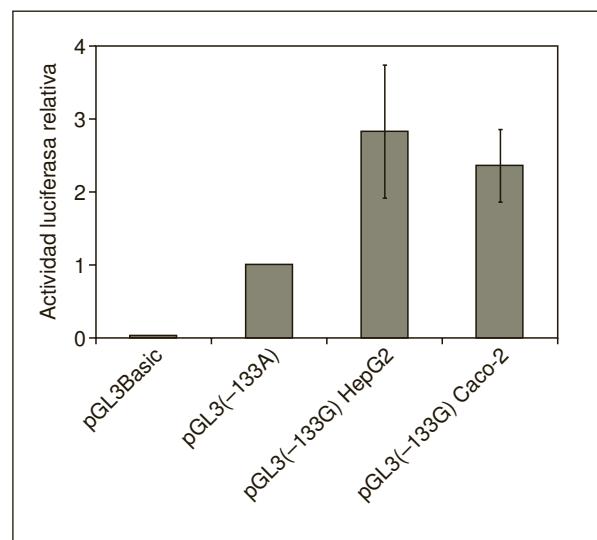


Figura 3. Efecto del polimorfismo -133A>G en la actividad transcripcional del promotor del gen *NPC1L1* en las líneas celulares Hep-G2 y Caco-2. En la gráfica se representa la media de la actividad luciférica normalizada. Las barras de error representan la desviación estándar de los 4 experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por triplicado en ambas líneas celulares para cada uno de las construcciones.

dad del promotor en las líneas Hep-G2 y Caco-2, respectivamente, en presencia de la variante -133G/G. Estos aumentos resultaron ser estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

## Discusión

Las regiones promotoras proximal y distal codifican secuencias diana para la unión de distintos factores de transcripción, reguladores de la transcripción<sup>14</sup> y, por tanto, son zonas que pueden tener polimorfismos capaces de modificar de manera relevante la expresión génica<sup>15,16</sup>. El análisis de las secuencias correspondiente a las variantes estudiadas en la región promotora de *NPC1L1* llevado a cabo mediante el software MatInspector<sup>17</sup> (Genomatix), determinó posibles sitios de unión para los factores de transcripción NF-1, STAT-1 y STAT-3 alrededor del polimorfismo -1473T>C, el factor c-Myb alrededor del polimorfismo -1128A>G, el factor RXR alrededor del polimorfismo -133A>G y el factor Sp1 alrededor del polimorfismo -18C>A. Este análisis mostró una mayor probabilidad de modificación de la secuencia consenso de unión del factor de transcripción RXR alrededor del polimorfismo -133A>G. El factor de transcripción RXR (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) forma parte de los receptores nucleares y forma heterodímeros con otros factores implicados en la regulación del metabolismo lipídico, como FXR, LXR o PPAR<sup>18</sup>. Teniendo en cuenta el resultado anterior, junto a la elevada frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo -133A>G, se seleccionó este último para analizar su posible efecto funcional sobre la transcripción del gen *NPC1L1*.

Para determinar la posible funcionalidad del polimorfismo -133A>G sobre la actividad transcripcional del gen *NPC1L1* se llevaron a cabo en primer lugar ensayos de retardo en gel o EMSA. Los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel revelaron la formación de complejos de las sondas con los extractos nucleares de Caco-2 en presencia de las 2 variantes alélicas para este polimorfismo y que estas interacciones mostraban diferente afinidad en función de la variante alélica presente en la sonda. Posteriormente, se realizaron ensayos de actividad luciférica y para ello se transfecaron de manera transitoria construcciones que contenían cada una de las variantes que se tenían que estudiar en las líneas celulares Caco-2 y Hep-G2. Nuestros resultados mostraron un efecto significativo del polimorfismo -133A>G en la actividad transcripcional del promotor del gen *NPC1L1*. El incremento de la actividad del promotor mostrado en presencia de la variante minoritaria -133G se podría explicar por

la modificación de un posible sitio de unión consenso de un factor de transcripción probablemente con efecto represor. Estos datos son coherentes con los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel donde la sonda que contenía la variante -133A mostró mayor afinidad de unión respecto a la sonda con la variante -133G. La presencia de la variante minoritaria -133G hace que disminuya la afinidad de unión del factor de transcripción con efecto represor por su sitio de reconocimiento y, por lo tanto, disminuya su regulación negativa demostrada con el incremento de la actividad transcripcional en presencia de ésta. El análisis realizado mediante herramientas bioinformáticas determinó que el polimorfismo -133A>G se encontraba en la posible secuencia de unión del factor de transcripción RXR. Para poder determinar la identidad del factor implicado se realizaron ensayos supershift con anticuerpo RXR $\alpha$ . Tal y como se muestra en la figura 2, en presencia de este anticuerpo, la banda retardada con la sonda portadora de la variante -133A desaparece, lo que sugiere que este factor de transcripción es el que se está uniendo a esta secuencia. Además, parece que la presencia del alelo -133G hace que se pierda un sitio de unión para RXR, y que cambie la especificidad de las proteínas por el ADN, puesto que la banda se mantiene en presencia de anticuerpo, lo que sugiere que otra proteína se está uniendo a este sitio.

Analizando nuestros resultados se podría considerar que la disminución de la regulación negativa podría estar asociada a un aumento de la funcionalidad del transportador *NPC1L1*, dando lugar a un incremento de la absorción intestinal de colesterol. Sin embargo, en nuestro estudio no se determinó la concentración de esterolos vegetales o fitoesterolos, utilizados como marcadores de la absorción intestinal de colesterol<sup>19</sup>, por lo que sería necesario su determinación en estudios posteriores para verificar que la variación de expresión pudiera dar lugar a un efecto fenotípico real. Es razonable considerar que los efectos mostrados en los ensayos con genes reporteros se puedan correlacionar con variaciones de expresiones in vivo; sin embargo, se debería confirmar la fiabilidad y validez de estos resultados mediante comparación de los datos obtenidos con otras técnicas. A la hora de determinar los posibles efectos sobre la transcripción de variaciones en la secuencia promotora de un gen, la utilización de genes reporteros es uno de los métodos de elección más utilizado y apropiado<sup>16</sup>. Sin embargo, en este ensayo se utilizan pequeñas cantidades de secuencia de ADN asociada al gen de estudio y, por lo tanto, el posible efecto observado en el análisis de la

secuencia se podría suprimir o modular por los efectos de otras secuencias localizadas a lo largo del genoma<sup>16</sup>.

En conclusión, hay diferencias en la afinidad de unión de proteínas nucleares y en la actividad transcripcional del promotor del gen *NPC1L1* en función del polimorfismo -133A>G, posiblemente debidas a la modificación del sitio de unión del factor de transcripción con posible efecto represor RXR. Estas diferencias de expresión observadas podrían estar relacionadas con la variabilidad individual en la absorción intestinal de colesterol.

## Bibliografía

- Lammert F, Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology*. 2005;129:718-34.
- Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:221-48.
- Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004;303:1201-4.
- Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (*NPC1L1*) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*. 2004;279:33586-92.
- García-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (*NPC1L1*). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:8132-7.
- Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics*. 2000;65:137-45.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. 1997;277:228-31.
- Sané AT, Sinnett D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Ménard D, et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res*. 2006;47:2112-20.
- Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem*. 2006;281:6616-24.
- Wang J, Williams CM, Hegele RA. Compound heterozygosity for two non synonymous polymorphisms in NPC1L1 in a non-responder to ezetimibe. *Clin Genet*. 2005;67:175-7.
- Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ, Arreaza MG, Qiu P, Monks SA, et al. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics*. 2005;86:648-56.
- Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, Esmail S, Vega GL, Grundy SM, et al. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:1810-5.
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grumber G, et al. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol*. 1996;16:2453-63.
- Pennacchio LA, Rubin EM. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet*. 2001;2:100-9.
- Mottagui-Tabar S, Faghihi MA, Mizuno Y, Engström PG, Lenhard B, Wasserman WW, et al. Identification of functional SNPs in the 5-prime flanking sequences of human genes. *BMC Genomics*. 2005;6:18.
- Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:17-28.
- Cartharius K, Fréch K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005;21:2933-42.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58:760-72.
- Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol*. 1990;131:20-31.