

2.3. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME LIPÍDIC: POSSIBLE AFECTACIÓ EN ELS RATOLINS MUTANTS.

Les composicions tissulars d'àcids grassos dels diferents ratolins mutants suggereixen que l'absència d'ALDP i/o d'ALDRP, així com la sobreexpressió d'ALDRP, poden conduir a modificacions en processos del metabolisme lipídic. Algunes de les vies afectades podrien ser la de la síntesi d'àcids grassos de 18 o més carbonis i la β -oxidació peroxisomal. En cadascuna d'elles hi participen enzims que poden ser regulats transcripcionalment a través d'un factor de transcripció o d'un receptor nuclear: SREBP^{262,263} en el cas de la síntesi d'àcids grassos i PPAR α en el cas de la β -oxidació peroxisomal²⁶⁴. Prenent com a hipòtesi que l'alteració d'un transportador peroxisomal pot afectar l'activitat d'algun receptor nuclear/factor de transcripció a través de l'acció d'algun substracte mal transportat, hem testat els nivells d'expressió de gens codificadors d'enzims implicats tant en la síntesi d'àcids grassos com en la β -oxidació peroxisomal. També hem inclòs en l'anàlisi altres gens controlats a nivell transcripcional per SREBP, PPAR α i LXR, per tal de completar l'estudi sobre la influència que poden tenir les alteracions del transport peroxisomal en la regulació de l'activitat d'aquests receptors nuclears/factors de transcripció.

2.3.1. NIVELLS D'EXPRESSIÓ DELS GENS CODIFICADORS DELS ENZIMS DE LA VIA SINTÈTICA DELS ÀCIDS GRASSOS.

La majoria de les alteracions detectades en teixits dels ratolins mutants que no es poden associar a una funció transportadora per part d'ALDP o d'ALDRP suggereixen una implicació del mecanisme de síntesi dels àcids grassos de cadena superior a 18 carbonis. Aquest procés té lloc principalment al RE, encara que el peroxisoma també hi té participació (veure figura 1.1, pàg. 5). En estudis realitzats en cultius cel·lulars i en animals manipulats genèticament s'ha vist que SREBP-1c controla l'expressió, a nivell transcripcional, de gens implicats en el procés de síntesi d'àcids grassos^{262,263}. Alguns dels gens que es troben sota aquest sistema de control són *elovl6*⁵, *scd*^{263,265}, *d6d* i *d5d*²⁶⁶. De forma secundària, els gens codificadors de les desaturases, *d6d*, *scd* i probablement *d5d*^{267,268}, també poden ser activats per proliferadors peroxisomals. La inducció d'aquests gens és posterior a la dels gens implicats en la β -oxidació, fet pel qual s'ha interpretat com una reacció compensatòria a l'increment de la demanda de PUFAs que provoca l'augment de la β -oxidació²⁶⁹.

L'expressió de SREBP-1c pot estar regulada transcripcionalment a través de LXR, els nivells de insulina i els de glucagó. Els PUFAs també poden controlar l'expressió de SREBP a través de 3 mecanismes diferents: inhibint l'activació de LXR al actuar de lligands antagonistes (a fetge) ^{270,271}, disminuint l'estabilitat del mARN de SREBP-1c (en hepatocits de rata) ²⁷², o reduint la forma nuclear de SREBP-1 (en línies cel·lulars i fetge de rata) ^{273,274}.

En base a la possible regulació transcripcional dels gens implicats en la via de síntesi dels àcids grassos, hem volgut analitzar la seva expressió en teixits dels nostres ratolins mutants. El nostre objectiu és comprovar si existeixen alteracions a aquest nivell que puguin explicar els canvis que hem observat en la composició d'àcids grassos dels diferents teixits.

Els gens analitzats són aquells que codifiquen per elongases i desaturases (veure figura 1.1, pàg. 5): *elov1-6* en el cas de les elongases, i *scd*, *d5d* i *d6d* en el cas de les desaturases. A part d'aquests, també n'hi hem inclòs dos que han estat identificats molt recentment, i pels quals la funció de la proteïna resultant és encara desconeguda. Aquests són *elov7* i *fads3*, que codifiquen per una elongasa i una desaturasa, respectivament. Hem estudiat el nivell d'expressió d'aquests gens, mitjançant RT-PCR quantitativa, a **cervell, medulla espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge del ratolí Wt**. Els resultats s'han representat a la figura 4.11 en el cas de les elongases i a la figura 4.12 en el cas de les desaturases. Els gens pels quals no s'han trobat nivells detectables d'expressió es mostren a través d'un espai en blanc al seu lloc corresponent a la gràfica. Això no exclou, però, l'existència d'un cert grau d'expressió per part d'aquests.

Els gens de les elongases s'han trobat ben expressats en tots els teixits excepte *elov2*, *elov3* i *elov4* (veure figura 4.11). En el cas d'*elov2*, hem detectat amplificació en tots els teixits excepte en el nervi ciàtic. En el cas d'*elov3* i *elov4*, s'observa un patró d'expressió complementari entre aquests dos gens: per *elov3* només s'ha detectat amplificació a fetge, fet que concorda amb dades publicades prèviament ⁸, mentre que per a *elov4* s'ha detectat amplificació en tots els teixits excepte a fetge. El patró d'expressió d'*elov4* resulta interessant pel fet d'incloure tots els teixits associats a la malaltia X-ALD en humans però no d'altres com el fetge, que no hi tenen cap relació. Això faria d'*elov4* un bon candidat com a gen implicat en el procés fisio-patològic de la X-ALD.

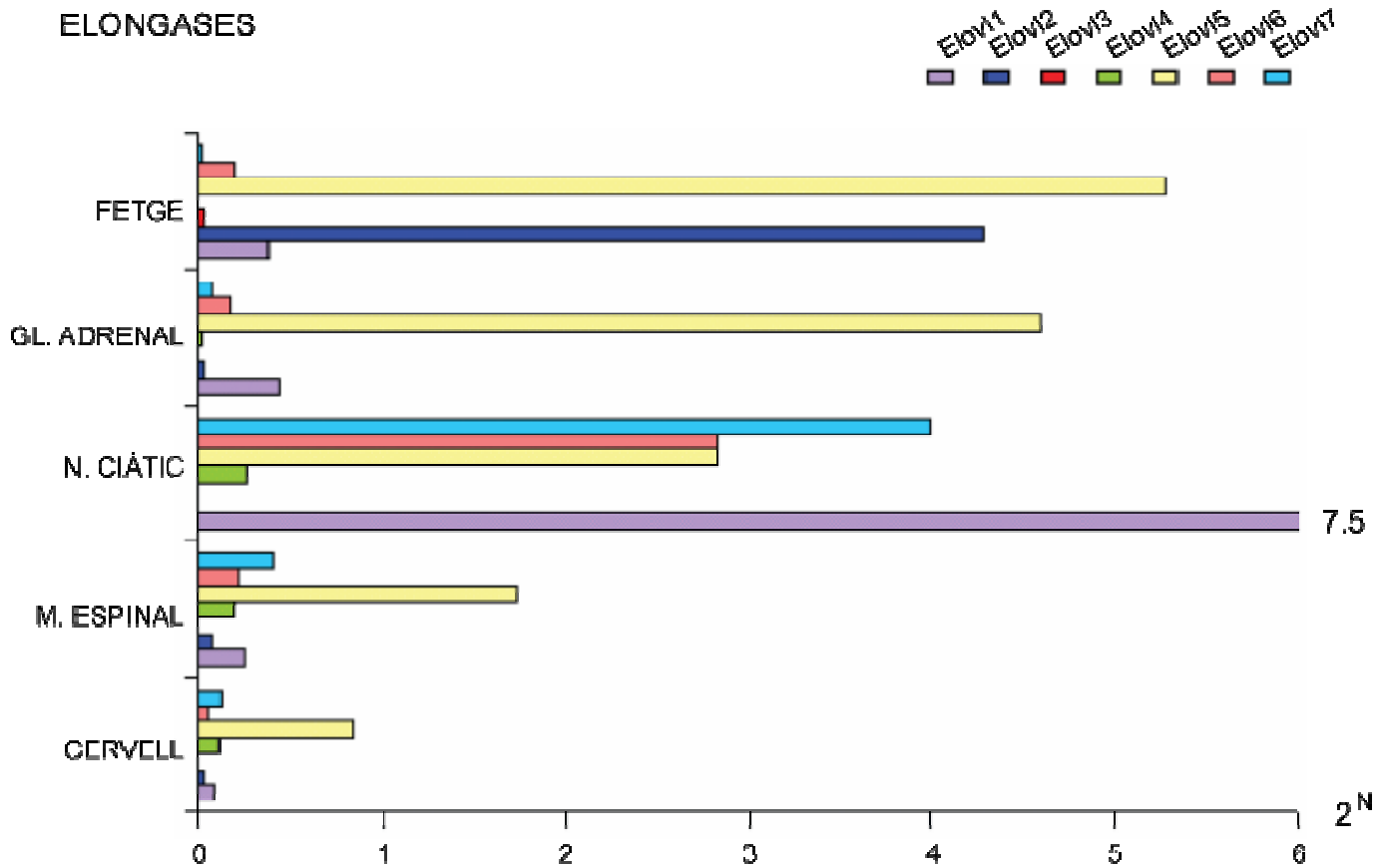


FIGURA 4.11. Nivells d'expressió dels gens codificadors de les elongases a cervell, medulla espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge del ratolí Wt. Aquests nivells s'han determinat a través del cicle mitjà d'amplificació obtingut per RT-PCR quantitativa. Cada columna representa el nivell d'expressió de cada gen en relació al d'hprt. Aquest valor està calculat com a 2^N , on N = cicle mitjà d'amplificació d'hprt - cicle mitjà d'amplificació del gen problema. En cada un dels teixits s'han representat els valors dels gens seguint l'ordre de la llegenda. Els espais en blanc indiquen que no s'ha detectat senyal d'amplificació per aquest gen. Per cada teixit s'han analitzat entre 3 i 6 mostres diferents d'ARN excepte pel nervi ciàtic, del qual només s'ha pogut disposar d'una. Cada mostra d'ARN s'ha obtingut, en la majoria dels casos, a partir d'un animal. En el cas de la glàndula adrenal i del nervi ciàtic ha calgut reunir els òrgans de 2 i de 4 animals, respectivament, per a l'obtenció de cada mostra.

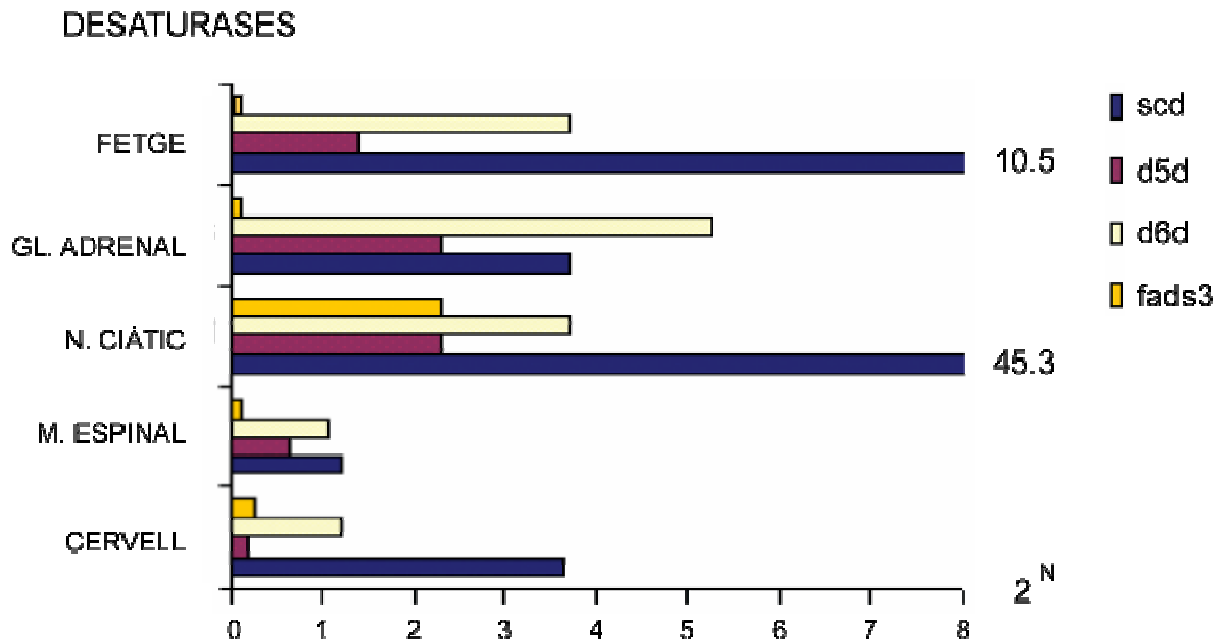


FIGURA 4.12. Nivells d'expressió dels gens codificadors de les desaturases a cervell, medulla espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge del ratolí Wt. Aquests nivells s'han determinat a través del cicle mitjà d'amplificació obtingut per RT-PCR quantitativa. Cada columna representa el nivell d'expressió de cada gen en relació al d'hprt. Aquest valor està calculat com a 2^N , on N = cicle mitjà d'amplificació d'hprt - cicle mitjà d'amplificació del gen problema. Per cada teixit s'han analitzat entre 3 i 6 mostres diferents d'ARN excepte pel nervi ciàtic, del qual només s'ha pogut disposar d'una. Cada mostra d'ARN s'ha obtingut, en la majoria dels casos, a partir d'un animal. En el cas de la glàndula adrenal i del nervi ciàtic ha calgut reunir els òrgans de 2 i de 4 animals, respectivament, per a l'obtenció de cada mostra.

A) ELONGASES

	elov1	elov2	elov3	elov4	elov5	elov6	elov7
CERVELL	3	1	-	4	28	2	4
M. ESPINAL	4	1	-	3	26	3	6
N. CIÀTIC	28	-	-	1	10	10	15
GL. ADRENAL	22	2	-	1	230	9	4
FETGE	19	214	2	-	264	10	1

B) DESATURASES

	sod	d5d	d6d	fads3
CERVELL	20	1	6	1
M. ESPINAL	9	5	8	1
N. CIÀTIC	20	1	2	1
GL. ADRENAL	34	21	48	1
FETGE	630	84	222	1

TAULA 4.3. Expressió intralissular relativa dels gens codificadors de les elongases (A) i de les desaturases (B). Les relacions s'han establert a partir dels valors 2^N de cada gen, representats a les figures 4.11 i 4.12 respectivament (N= cycle d'amplificació d'hprt - cycle d'amplificació del gen problema) Per a cada grup de gens i teixit s'ha donat el valor de 1 al gen d'expressió més feble. S'inclouen tots els teixits analitzats: cervell, medulla espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge.

En la família de les desaturases, els quatre gens analitzats es troben ben expressats en tots els teixits. El gen menys expressat en tots els teixits és *fads3*, mentre que els més expressats són *scd* i *d6d* (figura 4.12). De fet, si mirem la relació existent entre els nivells normalitzats d'expressió dels gens de les desaturases en cadascun dels teixits (taula 4.3B), s'observa que *scd* i *d6d* presenten un grau d'expressió similar tant a medulla espinal com als teixits extraneurals. En aquests mateixos teixits, l'expressió de *d5d* és lleugerament menor a la de *scd* i *d6d*. En canvi, a cervell i a nervi ciàtic hi ha una diferència marcada entre el nivell d'expressió de *scd*, *d6d* i *d5d*, essent sempre *scd* el més expressat i *d5d* el menys expressat.

Si ens centrem en la relació existent entre els nivells normalitzats d'expressió dels gens de les elongases en cadascun dels teixits (taula 4.3A), s'observa que el gen *elov5* és el més expressat en tots ells excepte a nervi ciàtic, on ho és *elov1*. Tal com hem indicat en la introducció (veure figura 1.1, pàg. 5), *elov5* està implicada en l'elongació de PUFAs⁹, mentre que *elov1* ho està en la d'àcids grassos saturats⁷. Si recuperem els valors tissulars de C18:0 i dels precursors C18:2 ω 6 i C18:3 ω 3 (concretament els valors relatius al total de la sèrie corresponent, marcats en verd a la taula A.1, pàg 123), s'observa una diferència entre el nervi ciàtic i la resta de teixits. Per una banda, el nervi ciàtic presenta els valors més baixos de C18:0, indicant el major grau d'elongació per a la sèrie d'àcids grassos saturats en aquest teixit. Per l'altra, el nervi ciàtic té els valors més alts de C18:2 ω 6 i de C18:3 ω 3, fet que denota que aquest teixit té el menor grau d'elongació per a les sèries de PUFAs. Aquestes característiques mostrarien una certa correlació amb el fet que *elov1* estigui més expressat que *elov5* en aquest teixit. A més d'això és important destacar que a nervi ciàtic no s'ha detectat expressió d'*elov2*, el qual codifica per un altre enzim implicat en la síntesi de PUFAs (veure figura 4.11). Així doncs, aquest podria ser també un factor limitador de la síntesi d'aquests compostos a nervi ciàtic.

2.3.1.1. Expressió en els ratolins mutants.

El nivell d'expressió dels gens codificadors dels enzims que participen en la síntesi dels àcids grassos s'ha analitzat en els ratolins **Ald ko**, **Ald/aldr ko** i **Wt/tg**, ja que són els que presenten més indicis (segons la composició d'àcids grassos dels seus teixits) d'una possible disregulació d'aquest procés. En el ratolí **Ald ko** hem detectat alteracions en els nivells de C22:0 i de C20:1 ω 9 que podrien ser degudes a modificacions en alguna elongasa implicada en la síntesi de saturats i de ω 9-MUFAs. A més, alguns autors han posat de manifest una possible implicació de la síntesi dels

àcids grassos en el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD al descriure un increment de la síntesi de C26:0 en fibroblastes de pacients ¹²⁷. En conseqüència, hem volgut comprovar si existeix un increment de l'expressió d'elongases/ desaturases en teixits del ratolí *Ald ko* que pugui participar en el mecanisme fisiopatològic del model murí. Pel què fa al ratolí ***Ald/aldr ko***, hem detectat increments sinèrgics d'àcids grassos saturats i de ω 9-MUFAs en diversos teixits, així com una disminució de la majoria de compostos de la sèrie dels ω 6-PUFAs a la glàndula adrenal. Aquests canvis suggereixen una implicació del procés de síntesi d'aquests compostos, de la mateixa manera que els efectes observats en les sèries de ω 3- i ω 6-PUFAs en el ratolí ***Wt/tg***.

El grup de gens analitzats inclou: *elov11*, *elov12*, *elov13*, *elov14*, *elov15*, *elov16* i *elov17*, els quals codifiquen per elongases, i *scd*, *d5d*, *d6d* i *fads3*, que codifiquen per desaturases. Els teixits analitzats per cada grup de ratolins són la medulla espinal, el nervi ciàtic i la glàndula adrenal. Per una banda, aquests teixits són els que presenten el nombre més gran d'anomalies en els nivells dels àcids grassos valorats en la secció precedent i, per l'altra, són els teixits implicats en la patologia desenvolupada pel ratolí *Ald ko* ^{251,253}. Les mostres utilitzades són les mateixes que s'han emprat per l'anàlisi dels gens codificadors dels transportadors ABCD, així com el procediment aplicat.

Per a tots aquests gens no hem detectat diferències significatives en el seu nivell d'expressió, respecte el *Wt*, en cap dels teixits procedents dels tres ratolins mutants. Així doncs, les alteracions observades en els nivells d'àcids grassos no obeïrien a canvis en el nivell d'expressió dels gens codificadors de les elongases i les desaturases. De la mateixa manera, podem descartar la implicació d'una disregulació transcripcional d'aquests gens en la fisiopatologia desenvolupada pel ratolí *Ald ko*. Aquests resultats, però, no exclouen l'existència d'alteracions en processos post-traduccionals que resultin en una modificació de la quantitat d'enzim, ni la d'alteracions en l'activitat enzimàtica, ja sigui general per tots els substractes o específica. Aquesta darrera possibilitat estaria recolzada per alguns resultats obtinguts en la determinació de la composició d'àcids grassos. Al nervi ciàtic del ratolí *Wt/tg* sembla produir-se un desplaçament de la síntesi dels àcids grassos saturats en favor de la dels ω 9-MUFAs, fet que recolzaria un canvi d'especificitat. Així doncs, caldria realitzar més experiments per tal de descartar completament la implicació del procés sintètic en les anomalies detectades en els nivells d'àcids grassos.

2.3.2. Expressió de gens codificadors d'enzims implicats en processos del metabolisme lipídic que tenen lloc al peroxisoma: β -oxidació i hipotètic sistema d'elongació.

La β -oxidació peroxisomal és un mecanisme important dins del metabolisme dels àcids grassos. Els transportadors ABCD són la porta d'entrada d'una colla de substractes que es β -oxiden al peroxisoma, ja sigui dins d'un context de degradació o dins d'un context de síntesi. En aquest últim cas hi ha inclosos els processos de retroconversió dels PUFAs i de la síntesi de determinats compostos d'aquestes sèries (C22:6 ω 3 i C22:5 ω 6). La disregulació dels gens que codifiquen per enzims clau d'aquests procés podria tenir una contribució en els nivells anòmals d'àcids grassos trobats en els ratolins mutants. El punt de control de la β -oxidació es troba sobre l'acil-CoA oxidasa, enzim que catalitza la primera reacció i que, a més, pot ser controlat a nivell transcripcional per PPAR α ²⁶⁴. Per això hem analitzat el nivell d'expressió del seu gen codificador (*aox*). Degut a les nombroses alteracions detectades en els nivells de PUFAS, també hem estudiat els gens que codifiquen pels enzims encarregats d'eliminar els dobles enllaços durant la β -oxidació dels àcids grassos amb insaturacions (Δ 3, Δ 2-enoil-CoA isomerasa (*ech*); Δ 3,5, Δ 2,4-dienoil-CoA isomerasa (*peci*); 2,4-dienoil-CoA reductasa (*decr2*). Aquests gens s'han trobat ben expressats en tots els teixits analitzats excepte *decr2*, pel qual no s'ha detectat expressió a nervi ciàtic. Al analitzar els nivells d'expressió d'aquests gens a medulla espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal dels ratolins Ald ko, Ald/aldr ko i Wt/tg, no s'han detectat diferències significatives respecte el Wt.

Un segon mecanisme que ens ha semblat interessant de testar és l'hipotètic sistema d'elongació existent al peroxisoma, ja que els transportadors ABCD podrien tenir algun tipus de connexió amb un procés de síntesi situat en el mateix orgànu. Tal com hem comentat en la introducció, aquest sistema estaria constituït per les 4 reaccions de la via de la β -oxidació en sentit revers (veure figura 1.4, pàg 15). Els enzims implicats serien els mateixos que participen en la β -oxidació excepte l'acil-CoA oxidasa, que no té la capacitat de catalitzar la reacció en ambdues direccions. És per això que es requereix l'acció d'una 2-enoil-CoA reductasa, enzim que ha estat identificat recetment al peroxisoma. Degut a l'especificitat d'aquest enzim pel procés de síntesi peroxisomal, hem analitzat el nivell d'expressió del seu gen codificador (*pecr*). Aquest gen es troba ben expressat en tots els teixits excepte a medulla espinal. Un cop més, però, no s'han trobat diferències significatives en el seu nivell

d'expressió, respecte el Wt, en cap dels teixits dels ratolins mutants Ald ko, Ald/aldr ko i Wt/tg.

2.3.3. Els àcids grassos insaturats com a lligands de receptors nuclears

L'activitat d'alguns receptors nuclears pot ser regulada a través dels àcids grassos o dels seus metabolits, tal com havíem vist que succeïa amb el factor de transcripció SREBP-1c. Entre aquests receptors nuclears hi ha els membres de les famílies PPAR i LXR, els quals formen heterodímers amb RXR²⁷⁵. Els àcids grassos que tenen un efecte regulador sobre l'activitat d'aquests receptors nuclears són, principalment, els PUFAs, tot i que també s'han descrit efectes causats per ω 9-MUFAs i per LCFAs^{276,277}. De tota manera encara queda molt per descobrir, tant a nivell de compostos implicats en aquests processos com en les especificitats que poden existir en els diferents teixits. I és que cal tenir en compte que la major part dels estudis s'han realitzat en fetge o en cultius d'hepatocits.

Davant d'aquests fets, ens ha semblat interessant de testar si les alteracions detectades en els nivells de PUFAs i de ω 9-MUFAs en els teixits dels nostres ratolins, han modificat l'activitat d'algun d'aquests receptors nuclears. Si bé no hem detectat alteracions en els nivells d'expressió de gens de la síntesi d'àcids grassos regulats transcripcionalment a través de SREBP-1c, o del gen *aox*, regulat per PPAR α , hem volgut fer més complet aquest estudi i ampliar-lo a LXR. Per a això ens hem beneficiat encara de la RT-PCR quantitativa, i hem analitzat el nivell d'expressió de gens que són regulats transcripcionalment per aquests receptors nuclears. Els gens seleccionats codifiquen per l'enzim FAS (*fas*), implicat en la síntesi d'àcids grassos, pel receptor de HDL (*srb1*), i per ABCA1 (*abca1*) i ABCG1 (*abcg1*), relacionats amb el transport revers de colesterol. A fetge, l'expressió de *fas* està regulada a través de PPAR α , LXR i també de SREBP. L'expressió de *srb1* està sota control de PPAR α i LXR, mentre que la de *abca1* i *abcg1* ho està de LXR.

Els teixits analitzats inclouen la medulla espinal, el nervi ciàtic i la glàndula adrenal dels ratolins Ald/aldr ko i Wt/tg, ja que són els que presenten més variacions en els nivells de PUFAs i ω 9-MUFAs. En cap cas no s'han trobat diferències significatives, respecte el Wt, en els nivells d'expressió dels gens anteriors. El conjunt de tots aquests resultats ens porta a concloure que els nivells d'àcids grassos alterats dels teixits dels ratolins mutants, no afectarien l'activitat dels receptors nuclears

PPAR α i LXR ni del factor de transcripció SREBP-1c. També descartem que el mal transport d'algun substrate d'ALDP o d'ALDRP pugui influir en l'activitat d'aquests.

	CERVELL	M. ESPINAL	NERVI CIÀTIC	GL. ADRENAL	FETGE	SÉRUM
SATURATS	34.7±1.0	26.7±3.5	16.8±6.4	11.0±2.5	17.6±4.1	16.7±1.4
C18:0	33.5±0.2	18.8-1.1	9.0±3.7	10.3±2.3	15.1±0.3	15.0±0.1
C20:0	0.4±0.02	2.1±0.3	1.1±0.4	0.3±0.08	0.5±0.2	0.4±0.07
C22:0	0.5±0.08	2.4±0.3	2.2±0.8	0.2±0.08	0.8±0.1	0.8±0.1
C24:0	0.7±0.1	3.3±0.5	4.4±1.7	0.2±0.04	0.4±0.05	0.4±0.07
C25:0	0.1±0.07	0.1±0.03	0.1±0.05	0.01±0.002	0.01±0.003	0.02±0.002
ω9-MUFAs	28.3±0.5	52.7±2.1	46.2±2.1	34.7±3.5	20.6±7.1	12.0±1.4
C18:1n7	23.3±0.3	36.0±2.0	42.8±1.7	32.2±3.6	19.3±0.5	10.5±0.2
C20:1n7	2.5±0.2	8.6-1.1	1.0±0.3	1.9±0.2	0.7±0.1	0.4±0.1
C22:1n7	0.3±0.1	0.8±0.1	0.2±0.07	0.3±0.04	0.1±0.04	0.07±0.03
C24:1n7	2.7±0.3	7.3±0.8	2.2±0.9	0.5±0.1	0.5±0.3	1.0±0.2
ω6-PUFAs	18.2±0.7	13.4±3.7	33.8±6.6	46.3±1.3	47.3±2.8	59.3±0.4
C18:2n6	1.4±0.2	4.3±2.7	31.4±7.2	36.1±4.0	33.9±3.0	45.2±2.5
C20:2n6	0.8±0.2	0.6±0.1	0.3±0.03	1.5±0.5	1.9±0.2	1.5±0.4
C20:4n6	12.5±0.4	5.4±1.6	1.4±0.3	6.4±2.2	11.5±2.8	12.5±2.0
C22:4n6	3.1±0.2	2.4±0.7	0.3±0.1	2.1±0.9	n. d.	0.1±0.02
C22:5n6	0.4±0.07	0.7±0.3	0.4±0.2	0.2±0.09	n. d.	0.05±0.01
ω3-PUFAs	18.8±0.7	7.2±0.8	3.2±0.8	8.0±1.5	14.5±1.0	12.0±0.9
C18:3n3	n. d.	0.3±0.2	1.6±0.6	1.8±0.4	1.1±0.5	0.8±0.1
C20:3n3	0.1±0.03	0.1±0.02	0.1±0.02	0.8±0.1	1.2±0.3	1.8±0.8
C22:3n3	0.2±0.1	0.3±0.05	0.3±0.06	2.2±0.7	0.9±0.3	0.5±0.1
C22:5n3	18.5±0.1	6.5±0.3	1.2±0.1	3.4±0.9	11.3±1.0	9.0±0.2

TAULA A.1. Composició tissular d'àcids grassos en el ratolí WT de 8 mesos de vida. Els nivells de cada un dels components estan expressats en percentatges. El primer valor correspon al percentatge (mitjana ± desviació estàndard) relatiu a total d'àcids grassos analitzats en el teixit (columna en blanc). El segon valor correspon a percentatge (mitjana) referit a la sèrie d'àcids grassos a la qual pertany el compost (columna en verd). El percentatge global de cada sèrie (mitjana ± desviació estàndard), obtingut a partir de la suma dels valors de tots els seus components, està indicat en taronja. El valor de cada compost s'ha obtingut a partir de l'àrea del seu pic corresponent. Totes les valoracions s'han realitzat a través de l'anàlisi d'un mínim de 4 mostres. En el cas del cervell, la medulla espinal i el fetge, cada mostra correspon a teixit procedent d'un sol ratolí. Per a nervi ciàtic i glàndula adrenal, cada mostra està constituïda per un grup d'òrgans procedents de 4 animals. "n. d." e cas del sèrum, cada mostra correspon al fluid obtingut per a dos ratolins.

