

L'obtenció d'una teràpia efectiva per a la malaltia X-ALD, causada per un defecte en el transportador peroxisomal ALDP, és un dels principals objectius dins l'àrea d'estudi d'aquesta malaltia. El treball presentat en aquesta memòria de tesi es centra en l'estudi de les proteïnes ALDP i ALDRP, degut a la redundància funcional que sembla existir entre elles, i a la possible aplicació terapèutica que se'n derivaria. Aquest treball preté aportar nous coneixements sobre el paper de les proteïnes ALDP i ALDRP en el metabolisme lipídic, així com dels efectes que hi té la sobreexpressió d'ALDRP, mitjançant l'estudi de teixits procedents de ratolins "knockout" i transgènics. De forma complementària, també vol donar noves llums sobre el mecanisme fisiopatològic de la X-ALD mitjançant la utilització de micromatrius de cADN.

Els objectius concrets d'aquest treball són els següents:

- 1) Demostrar que la sobreexpressió d'*aldr* en el ratolí Ald ko és capaç de corregir, per si sola, els nivells anòmals de C26:0 en diferents teixits diana de la malaltia.
- 2) Determinar si la pèrdua o la sobreexpressió d'un transportador de la família ABCD en teixits murins (com succeeix en els ratolins Ald ko, Aldr ko, Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg) condueix a una modificació del nivell d'expressió dels altres membres d'aquesta família.
- 3) Determinar substractes específics d'ALDP i d'ALDRP mitjançant l'estudi de la composició d'àcids grassos saturats, ω 9-MUFAs, ω 3-PUFAs i ω 6-PUFAs en teixits dels ratolins Ald ko, Aldr ko i Ald/aldr ko.
- 4) Determinar efectes de la sobreexpressió d'ALDRP sobre la composició d'àcids grassos saturats, ω 9-MUFAs, ω 3-PUFAs i ω 6-PUFAs en teixits murins.
- 5) Determinar si l'absència d'ALDP i/o d'ALDRP o la sobreexpressió d'ALDRP tenen algun efecte sobre l'activitat de PPAR α , LXR i/o SREBP, sobretot en relació a la regulació transcripcional dels següents mecanismes:
 - síntesi d'àcids grassos al RE
 - β -oxidació peroxisomal
- 6) Monitoritzar l'expressió gènica a gran escala en fibroblastes embrionaris de ratolí Ald ko i Wt, mitjançant micromatrius de cADN. Determinació d'efectes en l'expressió gènica associats a:
 - L'absència d'ALDP (genotip Ald ko)
 - El tractament amb àcid hexacosanoic (C26:0)

1. MATERIAL

1.1. ANIMALS

El ratolí **Ald ko** va ser cedit pel Dr. Kirby Smith (The Kennedy Krieger Institute, Baltimore, USA) ²⁵¹. Els ratolins **Aldr ko** i **Wt/tg** van ser generats a l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Strasbourg, França) ²⁵⁴. A través de Western blot s'ha demostrat que el ratolí **Aldr ko** mostra una absència total de proteïna ALDRP en tots els teixits analitzats, mentre que el ratolí **Wt/tg** presenta una sobreexpressió de la proteïna ALDRP situada entre 5 i 10 vegades respecte els nivells detectats en el Wt. Els ratolins **Ald/ald ko** i **Ald/tg** van ser obtinguts a l'IGBMC a través del creuament de ratolins mutants ²⁵⁴.

Tots els ratolins utilitzats en aquest treball són mascles. Per a la determinació de la composició d'àcids grassos hem emprat animals de fons genètic C57BL/6J ($\geq 75\%$) / 129Sv, mentre que pels experiments de RT-PCR quantitativa (Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) hem utilitzat ratolins de fons genètic pur C57BL/6J.

1.1.1. GENOTIPATGE DELS RATOLINS

El genotipatge dels ratolins ha estat realitzat a través de PCR (Polymerase Chain Reaction). L'ADN utilitzat prové d'una porció de cua del ratolins, que ha estat obtinguda dins de les dues primeres setmanes de vida dels animals.

1.1.1.1. Extracció d'ADN a partir de les cues de ratolí.

1.1.1.1.1. Material i reactius

- Tampó de lisi: 50mM Tris / 5mM EDTA / 1% SDS / 200mM NaCl
- Solució de proteinasa K: 10mg/ml de proteinasa K en aigua
- TE: 10mM Tris HCl pH=7.5 / 1mM EDTA

1.1.1.1.2. Procediment

- 1) Digestió de les cues: posar cada cua en un tub Eppendorf amb 5µl de solució de proteinasa K i 500 µl de tampó de lisi. Deixar o/n a 55°C.
- 2) Posar 500 µl de fenol/ cloroform (v/v) i agitar durant 15 minuts.
- 3) Centrifugar 5 minuts a 13000 rpm.
- 4) Traspasar la fase superior a un altre tub Eppendorf i descartar la resta.
- 5) Afegir 2 volums d'etanol 80%.

- 6) Centrifugar 15-20 minuts a 13000 rpm i a 4°C.
- 7) Retirar l'etanol i deixar assecar el "pellet" d'ADN.
- 8) Ressusprendre el "pellet" d'ADN en 200 µl de TE 20:1.

1.1.1.2. Condicions de PCR

1.1.1.2.1. Determinació del genotip *Ald ko*

Encebadors (5' → 3'): Directe (D): caa gac cta gct tca cag a

Revers (R): tag tcc ctg gag cct tg

Programa de PCR:

Temperatura (°C)	Temps (seg)	Nombre de cicles
96	300	1
94	40	10
58	30	
68	90	
94	40	30
53	30	
68	90	
68	600	1

L'al.lel *ald Wt* dona lloc a una banda de 400 parells de bases (pb), mentre que l'al.lel *ald ko* dona lloc a una banda de 1300pb.

1.1.1.2.2. Determinació del genotip *Aldr ko*

Encebadors (5' → 3') : D: gac cta gtg tca ttg ttc tg

R1: tgc aat cca tct tgt tca atg g

R2: taa cct gct agt tca gtg at

Programa de PCR:

Temperatura (°C)	Temps (seg)	Nombre de cicles
96	300	1
94	10	30
55	30	
72	60	
72	600	1

Els encebadors D i R1 amplifiquen una banda de 550pb corresponent a l'al.lel *aldr* ko mentre que els encebadors D i R2 amplifiquen una banda de 650pb corresponent a l'al.lel *aldr* Wt.

1.1.1.2.3. *Determinació del genotip transgènic (tg, sobreexpressió d'aldr)*

Encebadors (5' → 3'): D: gaa ata cca cac tca tct at

R: att ggc cac acc agc cac ca

Programa de PCR:

Temperatura (°C)	Temps (seg)	Nombre de cicles
96	300	1
94	10	35
53	10	
68	90	
68	600	1

Els encebadors amplifiquen una banda de 400pb del transgen.

1.2. MOSTRES

1.2.1. ÒRGANS

Els ratolins han estat sacrificats per asfíxia a través de diòxid de carboni. Immediatament després hem procedit a la dissecció i recuperació dels diferents òrgans d'interès: **cervell, medul.la espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge**. Els òrgans han estat congelats de forma ràpida a través de nitrogen líquid i posteriorment emmagatzemats a -80°C fins al moment de la seva utilització.

1.2.2. SÈRUM

Els ratolins de 8 mesos d'edat han estat anestesiats i, en el moment en què l'animal ha perdut el coneixement, hem procedit a l'obertura de la seva cavitat abdominal i a la punció de vena porta. La sang ha estat succionada lentament fins a obtenir-ne el màxim volum (aproximadament 1300µl). L'animal ha estat sacrificat immediatament després. La sang ha estat traspasada en tubs amb EDTA 0.2µM i guardada a temperatura ambient. En tots els casos s'ha unit la sang procedent de dos ratolins del mateix genotip per tal d'obtenir una mostra de major volum. La separació del sèrum a partir d'aquestes mostres s'ha realitzat el mateix dia de l'obtenció de la sang a través d'un gradient amb Histopaque (SIGMA 1077-1) i seguint les instruccions

indicades pel fabricant. Les mostres de sèrum s'han guardat a -20°C fins al moment de la seva utilització.

1.2.3. FIBROBLASTES EMBRIONARIS DE RATOLÍ (MEF: Mouse Embryonic Fibroblasts)

1.2.3.1. Obtenció dels cultius de MEF

1.2.3.1.1. Material i reactius

- Medi de cultiu: Medi elemental mínim (MEM) (Dulbecco) / 10% de sèrum boví fetal / Gentamicina ($40\mu\text{g/ml}$).
- Solució de Tripsina 2.5%
- PBS 1X: 0.3mM KCl / $0.15\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ / 14mM NaCl / $0.8\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ (pH= 6.8)

1.2.3.1.2. Procediment

1) Creuar un ratolí mascle Wt o Ald ko amb dues o tres femelles heterozigotes per l'al.lel *ald* ko. Realitzar un control matinal diari per determinar si hi ha hagut còpula, fet que es posa de manifest a través de l'aparició d'un tap de semen a la vagina de la femella.

2) Prendre un ratolí femella (heterozigota Ald) en estat de gestació i sacrificar-la quan es compleix el dia 13 d'aquest període. El compte es realitza a partir del dia en què s'ha observat el tap de semen vaginal.

2) Obrir l'abdomen de la femella i prendre l'úter amb els embrions en PBS 1X estèril. Aïllar cada embrió i eliminar qualsevol resta de sac embrionari.

3) Tallar el cap dels embrions i guardar-lo pel genotipatge. Extreure l'ADN aplicant el protocol descrit a la secció 1.1.1.1 (pàg. 51) i determinar el genotip a través de PCR (secció 1.1.1.2.1, pàg. 52).

4) Obrir els embrions i extreure totes les vísceres.

5) Tallar finament cada embrió en una placa de Petri individual amb 2ml de solució de tripsina 2.5%.

6) Incubar a 37°C durant 10-15 minuts.

7) Afegir 10ml de medi de cultiu a cada placa i homogenitzar bé.

8) Incubar a 37°C durant tota la nit

9) Canviar el medi per tal d'eliminar totes les restes i les cèl.lules que no s'han fixat a la placa. Incubar a 37°C durant 24h.

10) Els cultius són normalment confluents. Es fa un primer passatge de les cèl.lules en diversos falcons i s'incuba a 37°C fins a la confluència.

1.2.3.2. Tractament dels cultius amb àcid hexacosanoic (C26:0).

Tant bon punt es disposa del genotip dels clons (embrions), es descarten tots els de sexe femení. L'experiment es continua si resten 2 clons wt i 2 clons Ald ko de sexe masculí procedents de la mateixa camada.

1.2.3.2.1. Material i reactius

- Solució 5mM de C26:0 (SIGMA) en etanol. És necessari d'escalfar a 60°C i en constant agitació per tal que es dissolgui. Protegir de la llum.
- Medi de cultiu: MEM (Dulbecco) / 10% de sèrum boví fetal / gentamicina (40µg/ml)
- Medi d'inanició: MEM (Dulbecco) / gentamicina (40µg/ml)
- Medi (+C26:0): MEM (Dulbecco) / 10% de sèrum boví fetal / gentamicina (40µg/ml) / 8.2µM de C26:0. Es prepara just abans de ser utilitzat.
- Medi (+Etanol): MEM (Dulbecco) / 10% de sèrum boví fetal / gentamicina (40µg/ml) / Etanol en un volum equivalent al de solució de C26:0 utilitzat al preparar el medi (+C26:0). Es prepara just abans de ser utilitzat.
- PBS1X: 0.3mM KCl / 0.15mM KH₂PO₄ / 14mM NaCl / 0.8mM Na₂HPO₄ (pH= 6.8)

1.2.3.2.2. Procediment

- 1) Prendre els cultius unes hores després del passatge 2.
- 2) Substituir el medi de cultiu pel medi d'inanició i deixar incubant tota la nit a 37°C.
- 3) Treure el medi d'inanició. Del total de falcons disponibles per a cada clon, posar medi (+C26:0) en una meitat i medi (+Etanol) en l'altra. Deixar incubar durant 48h a 37°C.
- 4) Recuperació de les cèl.lules per a l'anàlisi en cromatografia de gasos (A) i per a l'obtenció d'ARN per a les micromatrius de cADN (B).

(A) Tripsinitzar els cultius

Recuperar les cèl.lules i rentar dues vegades amb PBS 1X estèril.

Guardar a -80°C.

(B) Recuperar les cèl.lules directament en Trizol (1ml/ cm² de superfície de cultiu)

Guardar a -80°C.

2. MÈTODES

2.1. CROMATOGRAFIA DE GASOS PER A LA DETERMINACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS (CromG).

2.1.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES LIPÍDICS.

Els extractes lipídics s'han obtingut a partir de cervell, medul.la espinal, fetge, glàndula adrenal i nervi ciàtic procedents dels diferents ratolins mutants (Ald ko, Aldr ko, Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg), així com dels ratolins Wt. Segons el teixit, s'han utilitzat dos protocols lleugerament diferents (protocol 1 i protocol 2), basats en el mètode de Folch²⁵⁵. Per a **cervell i medul.la espinal** s'ha emprat el **protocol 1**, mentre que per a **nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge** s'ha aplicat el **protocol 2**.

En el cas de **cervell, medul.la espinal i fetge**, cada mostra s'ha obtingut a partir de teixit procedent d'un sol animal (entre 100 i 200 mg, aproximadament). Per a cada teixit i genotip s'han processat un mínim de 4 mostres diferents per a cada un d'aquests teixits. En el cas de la **glàndula adrenal** i del **nervi ciàtic**, cada mostra reuneix els òrgans de 4 animals diferents. Per als genotips Ald/tg i Wt/tg, s'han obtingut dues mostres diferents de cadascun d'aquests dos teixits, mentre que per a la resta de genotips s'ha pogut disposar d'un mínim de 3 mostres.

2.1.1.1. PROTOCOL 1

2.1.1.1.1. Material i reactius

- Cloroform: Merck Suprasolv ref.: 1.02432
- Metanol: Merck Suprasolv ref.: 1.06011
- BHT (Butylated hidroxytoluene): SIGMA Ref. B1378

Tot el material ha de ser de vidre, amb taps protegits per tefló en la part que està en contacte amb la mostra, i ha de ser rentat amb Cloroform/metanol (2:1) abans de ser utilitzat.

2.1.1.1.2. Solucions

- Solució 1: Cloroform/ metanol (1:1) amb BHT (50mg/litre).
- Solució 2: Cloroform/ metanol (2:1) amb BHT (50mg/litre).
- Solució 3: Cloroform amb BHT (50mg/litre).
- Solució 4: KCl 1.1M / Metanol / Cloroform (25:25:1)

2.1.1.1.3. *Procediment*

- 1) Homogenització del teixit en 5ml de solució 1.
- 2) Centrifugar 10 minuts a 3000 rpm. Traspasar el sobrenedant a un altre tub.
- 3) Rentar el "pellet" amb 1ml de solució 2.
- 4) Centrifugar 10 minuts a 3500 rpm. Traspasar el sobrenedant al mateix tub que conté l'obtingut en el pas 2.
- 5) Afegir 2.5ml de solució 3 al tub que conté els sobrenedants dels passos 2 i 4.
- 6) Afegir aigua MilliQ en un volum equivalent al 20% del volum total obtingut al finalitzar el pas 5.
- 7) Agitar vigorosament durant 1 minut i guardar a 4°C durant 24h.
- 8) La mescla del dia anterior s'ha separat en dues grans fases, amb una interfase blanca de volum variable. Recuperar la fase superior sense prendre interfase i guardar-la a -20°C. Aquesta fase conté els gangliòsids i altres lípids polars.
- 9) Afegir un volum de solució 4 equivalent al de fase superior que acabem d'extreure.
- 10) Agitar vigorosament i guardar a 4°C durant 6-10h.
- 11) Descartar la fase superior. Conservar la fase inferior a -20°C. Aquesta fase equival a l'extracte lipídic total.

2.1.1.2. **PROTOCOL 2**

2.1.1.2.1. *Material i reactius*

- Cloroform: Merck Suprasolv ref.: 1.02432
- Metanol: Merck Suprasolv ref.: 1.06011
- BHT: SIGMA Ref. B1378

A partir del pas 4 és necessari treballar amb material de vidre netejat prèviament amb cloroform/ metanol (2:1). Els taps han d'estar protegits amb tefló per la part que està en contacte amb la mostra.

2.1.1.2.2. *Solucions*

- Solució 1: Metanol/ NaCl 0.58% (1:1)
- Solució 2: Cloroform/ metanol (2:1) amb BHT (50mg/litre).
- Solució 3: Cloroform amb BHT (50mg/litre).
- Solució 4: Cloroform/ metanol/ NaCl 0,58% (1:43:42)

2.1.1.2.3. *Procediment*

- 1) Homogenitzar el teixit en 2ml de solució 1.
- 2) Guardar en gel durant 1h.

- 3) Centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts. Traspassar el sobrenedant a un altre tub.
- 4) Rentar el "pellet" amb 1.5ml de solució 2.
- 5) Centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts. Traspassar el sobrenedant al mateix tub que conté l'obtingut en el pas 3.
- 6) Repetir els passos 4 i 5.
- 7) Afegir 2ml de cloroform al tub que conté els sobrenedants dels passos 3 i 5.
- 8) Agitar vigorosament durant 2 minuts i guardar-ho en gel durant 15-60 minuts.
- 9) Centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts. Traspassar la fase inferior a un altre tub.
- 11) Rentar la fase superior amb 2ml de solució 2.
- 12) Centrifugar 5 minuts a 3000 rpm. Traspassar la fase inferior al tub que conté l'obtinguda en el pas 9.
- 13) Repetir els passos 11-12.
- 14) Guardar la fase superior que resta a -20°C .
- 15) Afegir 2ml de solució 3 al tub que conté les fases inferiors obtingudes en els passos 9 i 12.
- 16) Agitar vigorosament durant 2 minuts i guardar en gel durant 15-60 minuts.
- 17) Centrifugar a 3000 rpm durant 5 minuts. Descartar la fase superior.
- 18) Guardar la fase inferior a -20°C .

2.1.2. TRANS-ESTERIFICACIÓ DE LÍPIDS (Tècnica de G. Lepage i C.C. Roy) ²⁵⁶

2.1.2.1. Material i reactius

- Hexà: MERCK Ref. 104368/1000;
- Metanol: MERCK Ref. 106011/1792;
- BHT: SIGMA Ref. B1378.
- Clorur d'acetil: Fluka ref 00990

Tot el material ha de ser de vidre, amb taps protegits per tefló en la part que està en contacte amb la mostra, i ha de ser rentat amb Cloroform/metanol (2:1) abans de ser utilitzat.

2.1.2.2. Solucions

- Solució d'estàndars: 0.125mg/ml de C19:0 / 0.025mg/ml de C27:0 dissolt en hexà.
- Solució 1: metanol /benzè (4:1) amb BHT (500mg/L).
- Solució 2: carbonat de potassi (6%) en aigua.

2.1.2.3. Procediment

- 1) Posar 50µl de solució d'estàndars a cada tub. Aquests seran utilitzats d'estàndars interns en el procés de detecció i quantificació dels esters de metil a través de cromatografia de gasos.
- 2) Afegir la mostra:
 - extractes lipídics dels teixits (fase inferior): 100µl
 - sèrum: 100µl
 - MEFs: homogenitzar el pellet de cèl.lules en 100µl d'aigua. Traspasar-ho tot al tub.
- 3) Afegir 2ml de solució 1.
- 4) En agitació constant en vòrtex, afegir molt lentament 200µl de clorur d'acetil a cada tub i tancar-lo amb força.
- 5) Incubar els tubs a 100°C durant 1 hora.
- 6) Refredar els tubs posant-los en gel.
- 7) Afegir 5ml de solució 2 (prèviament refredada a 4°C). Agitar per inversió.
- 8) Centrifugar a 4000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
- 9) Traspasar la fase superior de benzè a un altre tub i guardar-ho a -20°C fins el moment de la seva utilització.
- 10) Quan es vol procedir a la seva anàlisi per cromatografia, dessecar amb nitrogen gas.
- 11) Per injectar al cromatògraf, afegir 50-100µl d'hexà.

2.1.3. DETECCIÓ DELS ESTERS DE METIL A TRAVÉS DE CROMATOGRÀFIA DE GASOS.

La valoració dels esters de metil derivats dels àcids grassos pertanyents a les sèries de saturats, ω9-MUFAs i ω3- i ω6-PUFAs s'ha realitzat a través de cromatografia capilar gas-líquid. Per a això s'ha utilitzat un cromatògraf de gasos d'alta resolució (model 8000 Mega series. Fisons Instruments) equipat amb un sistema d'injecció split/splitless i un detector d'ionització de flama. Per a la separació dels àcids grassos saturats s'ha utilitzat una columna capilar de sílica-gel Megabore DB-1 (30m x 0.25mm Ø i 0.25µm de gruixudària, J&W). Les temperatures del port d'injecció i del detector han estat de 285°C i 300°C, respectivament. La injecció s'ha realitzat amb split/splitless (1 minut). El programa de temperatures del forn ha estat el següent: de 60°C (1 minut) a 210°C (1minut) a una velocitat de 35°C /minut; de 210°C a 285°C a una velocitat de 2°C/minut i manteniment de la temperatura a 285°C fins a l'elució de l'àcid hexacosanoic (C26:0).

Per a la separació dels PUFAs, hem injectat duplicats de les mostres en una columna Megabore DB-225 (30m x 0.25mm \varnothing i 0.25 μ m de gruixudària, J&W). Les temperatures del port d'injecció i del detector han estat de 220°C cadascuna. La injecció s'ha realitzat amb split/splitless (1 minut). El programa de temperatures del forn ha estat el següent: de 60°C (1 minut) a 180°C (1 minut) a una velocitat de 35°C/minut; de 180°C a 208°C (1 minut) a una velocitat de 2°C/minut; de 208°C a 220°C a una velocitat de 1°C/minut i manteniment de la temperatura a 220°C fins a l'el.lució de l'àcid docosahexaenoic (C22:6 ω 3).

Per a la identificació dels pics corresponents a cada àcid gras segons el temps de retenció, s'ha utilitzat una mescla d'estàndars formats per esters de metil dels àcids grassos saturats, ω 9-MUFAs i ω 3- i ω 6-PUFAs d'interès (obtinguts comercialment a SIGMA).

2.1.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els valors dels diferents àcids grassos (ester de metil derivats) s'han obtingut en percentatges respecte el total d'àcids grassos analitzats, i s'han expressat en forma de mitjana \pm desviació estàndar. Per a cada teixit estudiat, les diferències estadístiques existents per a cadascun dels compostos entre els diversos genotips s'han determinat a través d'ANOVA seguit pel test de Fisher, amb un valor $p \leq 0.05$ i $p \leq 0.01$. Per a la seva realització s'ha utilitzat el programa estadístic Statview versió 5.0.

En el cas de la glàndula adrenal i del nervi ciàtic dels ratolins Ald/tg i Wt/tg, només hem pogut disposar de dues mostres. Per aquest fet, les diferències estadístiques per a cada compost respecte el Wt s'han establert a través del test de Wilcoxon, amb un valor $p \leq 0.05$.

2.2. RT-PCR QUANTITATIVA (RT-PCR: Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction).

La PCR quantitativa és un sistema que permet monitoritzar la formació dels productes d'amplificació en temps real. La detecció de l'ADN sintetitzat es fa a través del SYBR Green I Dye, que és una molècula fluorescent que s'uneix a l'ADN de doble cadena, concretament a la cavitat menor que forma la doble hèlix. La fluorescència d'aquesta molècula és mínima quan està lliure en solució i només s'incrementa quan s'uneix a l'ADN. La molècula unida a l'ADN és molt estable (només es perd un 6% d'activitat durant 30 cicles d'amplificació).

Al començament de l'amplificació, la barreja de reacció conté l'ADN desnaturalitzat, els encebadors i la molècula de SYBR Green I. La poca fluorescència que emeten les molècules lliures de SYBR Green I és enregistrada com a soroll de fons. Després de la unió dels encebadors a l'ADN, algunes molècules de SYBR Green poden unir-se a la doble cadena, la qual cosa augmenta de manera significativa la seva fluorescència. A mida que l'elongació continua, la fluorescència augmenta de forma proporcional al nombre de molècules de SYBR Green que s'uneixen a l'ADN acabat de sintetitzar. Quan comença un nou cicle de PCR i l'ADN és desnaturalitzat, les molècules de SYBR Green s'alliberen i la fluorescència disminueix.

A mesura que transcorren cicles de PCR, la quantitat d'ADN augmenta de forma exponencial. D'aquesta manera, al representar gràficament el nivell de fluorescència aconseguit en cada cicle, s'obté una corba sigmoidea. El punt utilitzat per a la quantificació correspon al cicle de PCR en el qual comença la fase exponencial de la corba.

Aquest sistema de PCR també permet de realitzar una corba detallada de fusió dels productes de PCR. El punt de fusió d'un fragment d'ADN depèn de la seva longitud i del seu contingut en G/C. Així doncs, la corba de fusió pot ser utilitzada per caracteritzar els productes d'amplificació.

L'anàlisi de mostres d'ARN a través d'aquesta tècnica implica la prèvia transcripció reversa de l'ARN a ADN complementari (cADN). Els termocicladors de PCR quantitativa permeten la realització de la transcripció reversa de l'ARN dins del procés global. En el nostre cas, però, hem dut a terme els experiments en dues etapes separades: (i) transcripció reversa de l'ARN i (ii) PCR quantitativa a partir del cADN.

2.2.1. OBTENCIÓ DE L'ARN

Les mostres d'ARN s'han obtingut a partir de cervell, medul·la espinal, fetge, glàndula adrenal i nervi ciàtic procedents dels diferents ratolins mutants (Ald ko, Aldr ko, Ald/aldr ko, Wt/tg i Ald/tg), així com dels ratolins Wt. Per a cada teixit i genotip hem preparat entre 3 i 6 mostres d'ARN diferents exceptuant el nervi ciàtic, pel qual només hem pogut disposar d'una per a cada genotip.

Per a **cervell, medul·la espinal i fetge**, cada mostra d'ARN correspon al teixit d'un animal i s'ha obtingut a través del **protocol 1**. Pel què fa a **glàndula adrenal i nervi ciàtic**, s'ha utilitzat el sistema comercial **Rneasy Mini de Qiagen**. Aquest mètode es basa en una membrana de sílica-gel que reté l'ARN de l'homogenat tissular que es fa passar a través seu. Després de diversos rentats de la membrana, l'ARN és eluït amb aigua lliure de ribonucleases. En el cas de la glàndula adrenal s'han utilitzat els òrgans d'un mínim de dos ratolins per a cada mostra i s'han seguit estrictament les instruccions del fabricant. En el cas del **nervi ciàtic** s'ha emprat el teixit procedent de 4 animals per a cada mostra, i ha calgut fer algunes modificacions al protocol del fabricant degut a l'alt contingut fibrós d'aquest teixit. Aquestes modificacions s'especifiquen en el **protocol 2**.

2.2.1.1. PROTOCOL 1

2.2.1.1.1. Material i reactius

- Trizol (Invitrogen SARL)
- Cloroform, isopropanol, etanol (Prolabo)
- DEPC (Diethyl Pyrocarbonate Ribonuclease Inhibitor) (MP Biomedicals)

Tot el material ha de ser lliure de ribonucleases.

2.2.1.1.2. Solucions

- Aigua DEPC: diluir 200µl de DEPC en 2L d'aigua MilliQ. Deixar reposar tota la nit i autoclavar.

2.2.1.1.3. Procediment

- 1) Homogenitzar els teixits (entre 50-100mg) en 2ml de Trizol, sense descongelar-los prèviament.
- 2) Incubar 5 minuts a T^a ambient.
- 3) Afegir cloroform en un volum equivalent al 20% del de Trizol utilitzat. Agitar vigorosament durant 15 segons.

- 4) Incubar durant 2-3 minuts a T^a ambient.
- 5) Centrifugar 15 minuts a 8500rpm a 2-8°C. Traspasar la fase superior a un altre tub i descartar la resta.
- 6) Afegir isopropanol en un volum equivalent al 50% del de Trizol utilitzat, per tal de precipitar l'ARN.
- 7) Incubar 10 minuts a T^a ambient.
- 8) Centrifugar 10 minuts a 8500rpm a 2-8°C. Descartar el sobrenedant.
- 9) Rentar el "pellet" d'ARN en etanol 80%, amb un volum equivalent al de Trizol utilitzat. Agitar en vòrtex.
- 10) Centrifugar 5 minuts a 7500rpm a 2-8°C. Descartar el sobrenedant.
- 11) Deixar assecar el "pellet" d'ARN durant 5 minuts a T^a ambient.
- 12) Ressuspendre el "pellet" d'ARN amb 50µl d'aigua DEPC.
- 13) Incubar 5 min a 60°C per facilitar la resuspensió.

2.2.1.2. PROTOCOL 2

2.2.1.2.1. Material i reactius

- Trizol (Invitrogen SARL)
- Cloroform (Prolabo)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Tot el material ha de ser lliure de ribonucleases.

2.2.1.2.2. Procediment

- 1) Homogenitzar els nervis ciàtics de 4 ratolins en 1ml de Trizol.
- 2) Incubar 5 minuts a T^a ambient.
- 3) Afegir 200µl de cloroform i agitar vigorosament durant 15 minuts.
- 4) Incubar durant 2-3 minuts a T^a ambient.
- 5) Centrifugar 15 min a 8500 rpm a 2-8°C. Traspasar la fase superior a un altre tub i descartar la resta.
- 6) Afegir un volum d'etanol 70% i agitar bé. Traspasar-ho ràpidament a una columna Rneasy Mini de Qiagen i centrifugar 15 segons a més de 10000rpm.
- 7) Seguir el protocol indicat en el manual de Qiagen fins al final.

2.2.2. Transcripció reversa de l'ARN

La síntesi de cADN a partir de les mostres d'ARN total obtingudes dels diferents teixits murins s'ha realitzat amb el sistema comercial Superscript II Synthesis

System (Invitrogen). S'ha aplicat el protocol especificat pel fabricant, utilitzant en cada reacció:

- 500ng d'OligodT (encebadors específics per a les cues de poliadenina dels mARN; sintetitzats al servei comú d'oligonucleòtids de l'IGBMC)
- 500 μ M de dNTP (desoxiribonucleòtids trifosfat)
- 1 μ g d'ARN total.

2.2.3. Condicions de PCR

2.2.3.1. Disseny de l'experiment

En cada experiment de PCR quantitativa s'han inclòs:

- 3 mostres de cADN d'un determinat teixit i genotip mutant
- 3 mostres de cADN Wt del mateix teixit

Per a cadascuna d'aquestes mostres s'ha procedit a l'amplificació d'un gen problema i del gen *hprt* (*h*ypoxanthine *p*hosphor*i*ribosyl *t*ransferase). El gen *hprt* té un patró d'expressió ubiqüitari i permet d'estandaritzar la quantitat de cADN afegida a la reacció.

Amb una de les mostres de cADN Wt es realitza un banc de dilucions exponencial amb base 4: 4^{-1} (1/4), 4^{-2} (1/16), 4^{-3} (1/64), 4^{-4} (1/256). A partir d'aquest banc de dilucions es poden construir dues corbes estàndar a l'experiment, una pel gen problema i una pel gen *hprt*. D'aquesta manera es pot realitzar una quantificació relativa del nivell d'expressió de cada gen. Pel què fa a la resta de mostres de cADN incloses en l'experiment, s'ha utilitzat una dilució 1/16 per a les diferents reaccions d'amplificació. Finalment, també s'ha introduït el corresponent control negatiu d'amplificació per a cada un dels gens analitzats.

2.2.3.2. Encebadors

Tots els encebadors han estat dissenyats amb l'ajuda del programa informàtic *primer3*, al qual es pot accedir lliurement a través d'Internet (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). El disseny s'ha realitzat de manera que la temperatura d'hibridació (annealing) dels encebadors sigui de 60°C. Així es poden amplificar diferents gens de forma simultània en un mateix experiment. Els encebadors utilitzats per a l'amplificació de cadascun dels gens analitzats, així com la talla del fragment que amplifiquen, es toben recollits a la taula següent:

GEN	ENCEBADORS (5'→3') D=directe / R= revers	TALLA fragment amplificat
hprt	D: gta atg atc agt caa cgg ggg ac R: cca gca agc ttg caa cct taa cca	180 pb
Abcd1 (ald)	D: gcc aag ttg tgg atg tgg ag R: ttc cgc aga gtc ggg ata ga	299 pb
Abcd2 (aldr)	D: tag aac gca tcc tgc aca gc R: ctc ctt cgc cat cga att gt	306 pb
Abcd3 (pmp70)	D: ggc tgg gcg tga aat gac ta R: gcc gtt tgg acc aca aat ca	301 pb
Abcd4 (pmp69)	D: ttg ccg gtt aca cac aca gg R: ctt tca tgc cct ccc aca g	318 pb
Elovl1	D: ccc ttt gaa ccc ttc act gc R: caa tgt aga ggg aga gta tca cca g	283 pb
Elovl2	D: gct tcc cct ttg gct gtc tc R: gtt tgt gtt ccc cgg cac t	217 pb
Elovl3	D: tgg tcc ttc ttc ctg gca at R: cgt cat ccg tgt aga tgg ca	170 pb
Elovl4	D: cgc cct gtg gtg gta ttt tgt a R: tgc agc atg gtc agg tat cg	288 pb
Elovl5	D: ctc tcg ggt ggc tgt tct tc R: cta tga gcg tca ggg cac aa	291 pb
Elovl6	D: tct ggg ctt atg cat ttg tgc R: ctg gga caa ggt gat gaa ca	230 pb
Elovl7	D: tgc cac aaa cca tca tcc tg R: acc tgt acc cca gcc aga ca	178 pb
Scd	D: tcg ccc cta cga caa gaa ca R: gcc atg cag tcg atg aag aac	165 pb
D5d	D: cgc gga cat tgt tta ctc cct R: tcc ctc aag ttt ggt acc c	234 pb
D6d	D: gag cct gca tgt gtt tgt cct R: agc caa gtc cac cca gtc c	190 pb
Fads3	D: tga ctg tcg cac ctg tct tcc R: agc cca cag caa gtc cgt c	206 pb
Aox	D: gcc caa ctg tga ctt cca tt R: ggc atg taa ccc gta gca ct	170 pb
Ech	D: ggt gtg gac ctc gtt tct gc R: cag ctc gtt gac cag gct ct	153 pb
Peci	D: ctc agc aaa ggc agc tga ga R: cag cgt tga cgt cgt aga gc	221 pb
Decr2	D: cag ccc tct ggc ttc cta tgt R: ggc agg gtg gct ctt ttg ta	220 pb
Pecr	D: ggc gaa atg gga caa acc tt R: cct ggc ctc cat cca cat t	157 pb
Fas	D: ctt tgc tgc cgt gtc ctt ct R: cgt cac aca cct ggg aga g	210 pb
Sb-r1	D: tga tgc ccc agg ttc ttc ac R: gta ggg act ggg tgg ctg gt	185 pb
Abca1	D: acc agc ttc cat cct cct tg R: gaa cgg cca cat cca caa ct	207 pb
Abcg1	D: tga cac cat ccc agc cta cc R: aag atg ccc agg acg atg aa	216 pb

2.2.3.3. Reacció de PCR

En cada reacció de PCR s'ha amplificat un sol gen. Cadascuna de les reaccions d'ha realitzat per duplicat en el mateix experiment. La composició d'una reacció inclou:

- 1X de tampó (Tris/KCl) (Sigma)
- 4mM de clorur de magnesi (Sigma)
- 250 μ M de dNTP (servei IGBMC)
- 0.25 μ g/ μ l BSA (Bovine Serum Albumin. Sigma fracció IV)
- 0.1X SYBR Green (Sigma)
- 0.03U/ μ l de Taq polimerasa (casa com)
- 3ng/ μ l d'anti-Taq polimerasa (Ozyme)
- 5pmol de cada encebador (servei d'oligonucleòtids de l'IGBMC)
- 1 μ l de producte de transcripció reversa d'ARN (diluït, segons s'indica a l'apartat 2.2.3.1, pàg 64), o bé 1 μ l d'aigua Milli Q estèril en el control negatiu.
- aigua MilliQ estèril fins a 20 μ l de volum final

2.2.3.4. Programa de PCR

L'aparell utilitzat per a la realització de les PCR quantitatives és un termociclador LightCycler System (Roche Diagnostics, Meylan, France). El programa que s'ha aplicat és el següent:

Etapa	Temperatura (°C)	Temps (s)	Gradient (°C/s)	Nº cicles
Desnaturalització	95	600	20	1
Hibridització	95	15	20	40
	60	10	20	
	72	10	20	
Fusió	95	2	20	1
	60	30	20	
	95	0	0.1	
Refredament	40	30	20	1

2.2.4. Quantificació

El termociclador està acoblat a un sistema de detecció de la senyal fluorescent del SYBR Green anomenat ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Un programa informàtic elabora una fórmula per a la corba estàndar a partir de les quatre dilucions de la mostra Wt introduïdes per a aquest propòsit. Aquesta fórmula és de tipus lineal: $y=mx + b$ on y =cicle on comença la fase exponencial d'amplificació del procés de PCR (C_T), x =log de la concentració, m =pendent de la recta, i b =intersecció de la recta en l'eix y . És important destacar que l'eficiència dels encebadors és determinada a través de m . L'eficiència òptima d'una parella d'encebadors correspon a una $m=3.32$. Tots els encebadors utilitzats en els nostres experiments tenen una eficiència similar a aquesta.

Amb la corba estàndar obtinguda per a cada gen es calcula la seva concentració relativa en cada mostra de cADN a través del corresponent C_T . A partir d'aquestes dades es realitza la mitjana entre els dos duplicats de cada reacció (la desviació estàndar no ha de superar en cap cas el 5%. Si és així, es repeteix l'experiment per aquesta mostra). Finalment, per a cada mostra de cADN es normalitza la concentració del gen problema a través de la seva relació amb la concentració obtinguda pel gen *hprt*.

2.3. MICROMATRIUS DE cADN (cDNA ARRAYS)

Les micromatrius de cADN són dispositius de tamany petit on s'integren desenes de milers de sondes de cADN de seqüència coneguda, la qual cosa permet la realització d'estudis d'expressió gènica a gran escala. La posició que cada una d'aquestes sondes ocupa dins la matriu està exactament determinada. Quan una mostra de cADN procedent d'un teixit o cultiu cel·lular es posa en contacte amb la micromatriu, les cadenes complementàries a les sondes integrades s'hibridaran i quedaran retingudes. Si la mostra de cADN ha estat prèviament marcada amb un fluorocrom, es podran detectar els senyals lluminosos de les cadenes retingudes a la micromatriu. La informació generada serà posteriorment interpretada amb l'ajut de suport informàtic.

A l'IGBMC s'ha creat un servei destinat al desenvolupament de la tecnologia de les micromatrius, el qual permet la realització completa de tot el procés que comporta una experiència d'aquest tipus. Tal com es mostra a la figura 3.1, aquest procés consta de tres etapes principals: (i) construcció de la micromatriu (ii) preparació i marcatge fluorescent de les mostres de cADN (iii) hibridació de les mostres de cADN a la micromatriu, i quantificació i anàlisi estadística de les dades que se'n deriven.

2.3.1. Construcció de la micromatriu

La micromatriu de cADN utilitzada per a la realització dels nostres experiments ha estat dissenyada pel nostre equip i fabricada en el servei de microarrays de l'IGBMC. Està composta per 48.000 spots o dipòsits de sonda, que representen 16.000 gens murins. Hi ha inclosos gens codificadors d'enzims, de transportadors i de receptors nuclears i cofactors implicats en la síntesi i en la degradació d'àcids grassos i també en el metabolisme del colesterol i de lípids complexos. També s'hi han introduït totes les proteïnes peroxisomals identificades fins al moment. Per altra banda, hi ha enzims rellevants per a la síntesi i manteniment dels axons i de la mielina, molècules d'adhesió neural, factors de transcripció neuronals, canals iònics, proteïnes gap-junction i components de la mielina del SNC i del SNP. Finalment hem introduït citoquines i enzims implicats en inflamació, activació de la microglia, regeneració, degeneració i envelliment.

Per a cada un dels gens s'han seleccionat almenys dues EST (Expressed Sequences Tags) complementàries, que seran utilitzades per obtenir les sondes de la micromatriu. La selecció s'ha realitzat a través d'una comparació de la seqüència de

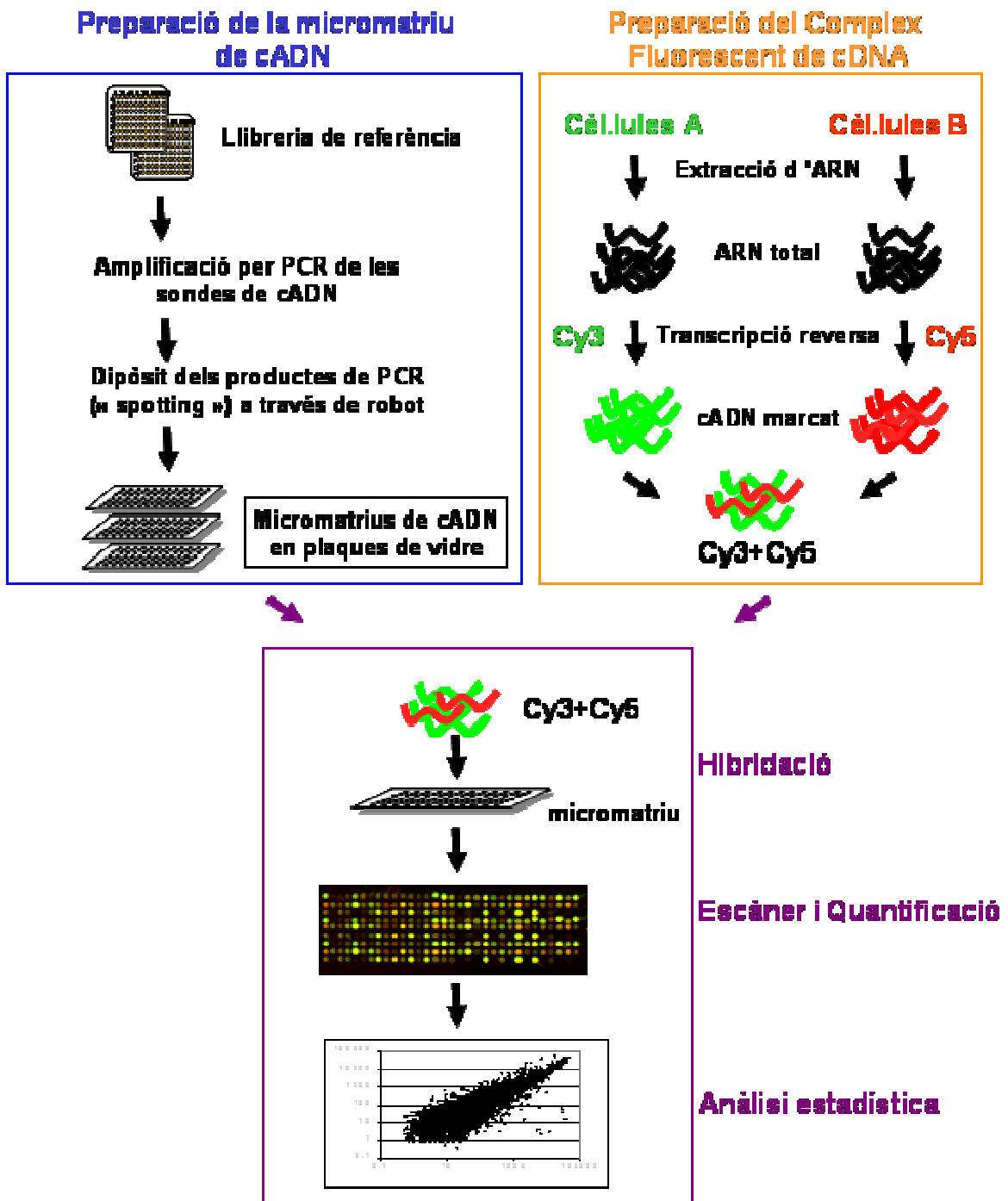


FIGURA 3.1. Tecnologia de les micromatrius de cADN.

cADN del gen corresponent amb un banc de ESTs. Per això s'ha utilitzat el programa BLAST, al qual es pot accedir lliurement a través d'Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Les EST seleccionades procedeixen de IMAGE Consorci.

2.3.2. Preparació i marcatge fluorescent de les mostres de cADN.

En l'experiment exposat en aquest treball hem analitzat l'expressió gènica en dos cultius de MEFs Ald ko i dos cultius de MEFs Wt. Tots ells procedeixen d'embrions de sexe masculí obtinguts en una mateixa camada. Després del passatge 2 de les cèl.lules, la meitat dels falcons de cada un dels clons s'ha tractat amb C26:0 (8.2 μ M) durant 48 hores mentre que l'altra meitat s'ha continuat cultivant en paral.lel amb medi estàndar. La concentració de C26:0 utilitzada pel tractament comporta un augment de 20 vegades del nivell d'aquest compost respecte l'existent en el medi estàndar (determinat prèviament a través de CromG).

Dels cultius de MEFs se n'han derivat, finalment, 8 mostres d'ARN total (taula 3.1), el qual s'ha obtingut a través de l'aplicació del protocol 1, descrit a la secció 2.2.1.1 (pàg. 62).

		Condicions de cultiu	
		Estàndar	+ C26:0
Genotip	WT	WT1	WT1 TR
		WT2	WT2 TR
	ALD KO	ALD1	ALD1 TR
		ALD2	ALD2 TR

Taula 3.1. Mostres d'ARN procedents dels cultius de MEFs

Tal com s'ha mostrat en la figura 3.1, en cada una de les hibridacions amb una micromatriu s'utilitza una barreja de dues mostres de cADN. Una d'elles és, normalment, una mostra de referència procedent de cèl.lules o de teixits control. L'altra mostra és qualsevol de les incloses dins l'estudi. Les dues mostres són marcades amb un fluorocrom diferent per tal de poder-les distingir: Cy3 (verd) i Cy5 (vermell). Després de la hibridació, es pot mesurar la intensitat emesa per Cy3 i Cy5 en cada una de les zones o "spots" de la micromatriu. A través de la relació d'aquestes dues intensitats es

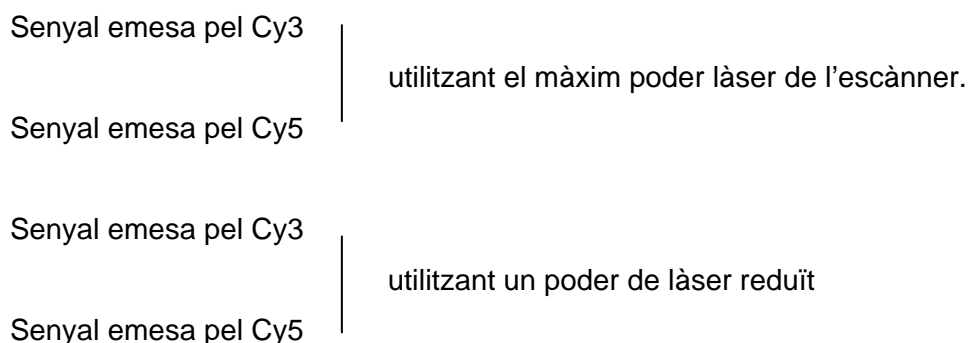
pot valorar la quantitat relativa d'una determinada molècula de cADN entre ambdues mostres. En el nostre cas, la mostra utilitzada com a referència és una barreja d'ARN de les mostres WT1 i WT2, que són els controls tant a nivell de genotip com de condicions de cultiu. La síntesi de cADN i el seu marcatge fluorescent ha estat realitzat pel servei de microarrays de l'IGBMC. Per a això els hem entregat 20µg d'ARN de cada una de les mostres. Aquests dos processos es realitzen de forma simultània al utilitzar dNTPs marcats amb fluorocrom durant la transcripció reversa de l'ARN (veure figura 3.2).

Per a cada una de les mostres recollides a la taula 3.1 s'han realitzat dues hibridacions independents en micromatriu. Per a una d'elles, la mostra X ha estat marcada amb Cy3 durant la síntesi de cADN, mentre que la mostra de referència ho ha estat en Cy5. Per a l'altra hibridació s'ha sintetitzat cADN de nou però, en aquest cas, marcant la mostra X amb Cy5 i la de referència amb Cy3 (veure figura 3.3). Les hibridacions en micromatriu i l'escàner de les imatges obtingudes han estat realitzades pel servei de microarrays de l'IGBMC.

2.3.3. Quantificació i normalització de les dades.

La quantificació consisteix en l'extracció de dades numèriques a partir de les imatges que s'obtenen de la micromatriu. Per a cadascuna de les plaques hibridades (16 en total) hem rebut 5 imatges en format TIF:

A) 4 imatges corresponents a la senyal emesa pel Cy3 i Cy5 de les mostres hibridades.



B) 1 imatge obtinguda a través de la rehibridació de les plaques amb una sonda universal marcada amb Cy3 o Cy5.

La precisió de la mesura per gens expressats de forma feble és molt millor utilitzant la imatge obtinguda amb el màxim poder làser de l'escàner. Per contra,

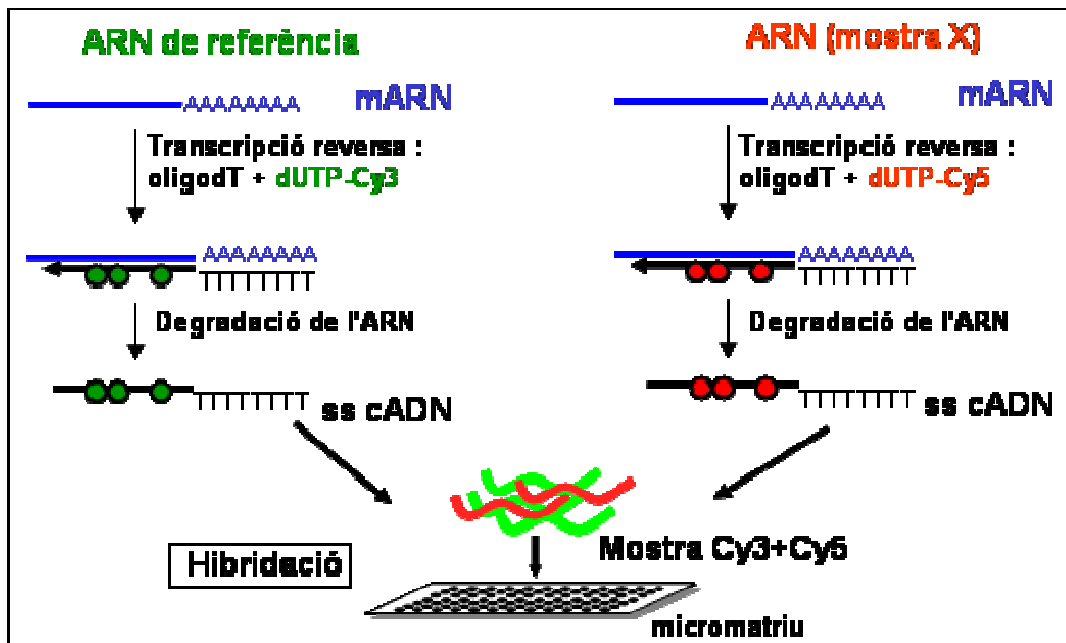


FIGURA 3.2. Síntesi de cADN i marcatge amb fluorocrom (ss cADN= ADN complementari de cadena senzilla; dUTP-Cy3 i dUTP-Cy5= desoxirribonucleòtids-5'-trifosfat d'uracil marcats amb els fluorocroms Cy3 i Cy5)

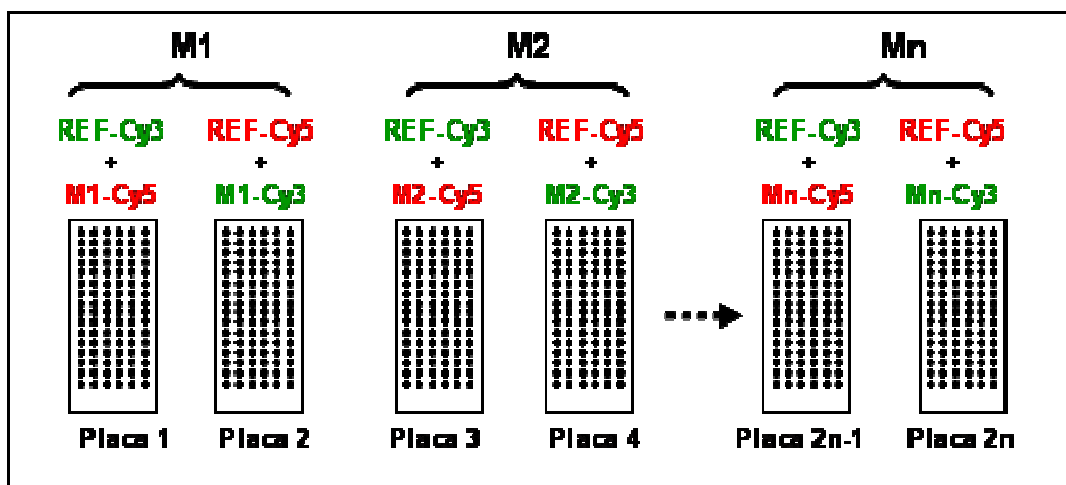


FIGURA 3.3. Esquema del procés seguit per cada una de les mostres d'ARN originals (M=mostra; REF=mostra de referència; Cy5 i Cy3=fluorocroms).

aquesta no és molt indicada pels gens fortament expressats, on la intensitat de la senyal arriba a la saturació. En aquests casos és molt més adequat utilitzar la imatge obtinguda amb el poder de làser reduït.

La imatge de la rehibridació amb la sonda universal ens permet de controlar la presència i la qualitat dels "spots" en cada una de les plaques. També ens és de gran ajuda en el procés de quantificació, que es realitza a través del programa informàtic Imagen 5.0 (Biodiscovery). Aquest procés comporta la creació d'una graella de cercles, on cada cercle envoltarà un spot de la micromatriu i limitarà la zona de quantificació de la intensitat de llum emesa. La imatge obtinguda amb la sonda universal ens permet de crear una graella que ajusti de manera perfecta a la nostra micromatriu, fet que es tradueix en una quantificació més acurada.

Al finalitzar el procés de quantificació obtenim un fitxer de dades numèriques per cada una de les 5 imatges disponibles per placa. En cada un d'aquests fitxers disposem de la intensitat mitjana de la senyal lluminosa per cada un dels "spots" de la micromatriu. A partir d'aquestes dades brutes es realitza una normalització per tal de reduir els efectes que poden causar certs problemes experimentals en la interpretació final de les dades. Aquests problemes experimentals inclouen: (i) diferències entre Cy3 i Cy5 en l'eficiència d'incorporació al cADN, en el nivell de detecció o en el rang d'intensitats emeses, (ii) efecte de zonació que es pot produir durant la hibridació. La normalització es realitza a través d'un programa informàtic que aplica el mètode de quantils.

2.3.4. Tractament estadístic de les dades obtingudes a través de la micromatriu de cADN.

Per cadascun dels gens analitzats a la micromatriu construïm quatre mostres:

- Mostra 1: inclou els resultats obtinguts dels clons Wt, independentment de si han estat tractats o no amb C26:0.
- Mostra 2: inclou els resultats obtinguts dels clons Ald ko, independentment de si han estat tractats o no amb C26:0.
- Mostra 3: inclou els resultats obtinguts dels clons que han estat tractats amb C26:0, tant Wt com ald ko.
- Mostra 4: inclou els resultats obtinguts dels clons que no han estat tractats amb C26:0, tant Wt com Ald ko.

Per veure l'efecte del genotip en l'expressió del gen, comparem la primera i la segona mostra utilitzant ANOVA amb $p \leq 0.05$. Per veure l'efecte del tractament amb C26:0 en l'expressió del gen, comparem la tercera i la quarta mostra amb la mateixa eina estadística.

Ha estat impossible d'analitzar estadísticament la interacció entre la variable genotip i la variable tractament amb C26:0 degut al nombre insuficient de mostres d'ARN disponibles per a cada condició ($n=2$, veure taula 3.1, pàg 70).

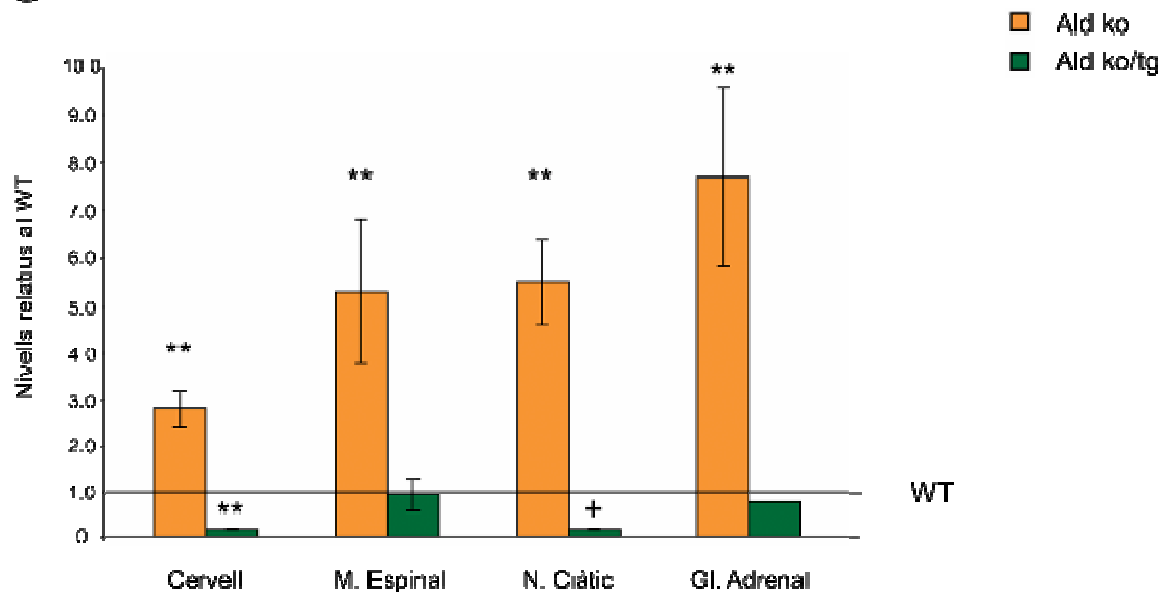
1. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIONI D'ALDRP EN ELS NIVELLS DE VLCFAs EN TEIXITS DEL RATOLÍ ALD KO.

El ratolí Ald ko presenta una acumulació d'àcid hexacosanoic (C26:0) en la majoria dels seus teixits, i des d'una edat molt temprana (com a mínim a partir dels 50 dies de vida ²⁵²). Per contra, les primeres afectacions neurològiques no apareixen fins als 15 mesos de vida ²⁵³. Per tal d'estudiar l'efecte que la sobreexpressió d'*aldr* (*abcd2*) té sobre els nivells tissulars de VLCFAs en el ratolí Ald ko, hem decidit emprar animals de 8 mesos de vida. A aquesta edat, la mielinització i la maduració sexual estan acabades, fet que redueix la variabilitat interindividual. A més, el ratolí Ald ko es troba en una fase anterior però propera a l'aparició dels primers símptomes neurològics. Entre els teixits que hem analitzat hi figuren el cervell, la medul.la espinal, el nervi ciàtic, la glàndula adrenal i el fetge, així com el sèrum. D'aquests, els únics teixits implicats en la patologia desenvolupada pel ratolí Ald ko són la medul.la espinal, el nervi ciàtic i la glàndula adrenal (fenotip similar a AMN) ²⁵³, mentre que en humans també hi ha una afectació del cervell en almenys un 50% dels casos (CCALD i formes cerebrals adolescents i adultes + 50% dels AMN).

1.1. NIVELLS DE C26:0 EN ELS RATOLINS ALD KO I ALD/TG.

La valoració del nivell de C26:0 s'ha realitzat a partir d'extractes lipídics totals de teixits procedents dels ratolins Ald ko i Ald/tg. Els resultats obtinguts, que corresponen al percentatge de C26:0 respecte el total d'àcids grassos analitzats de la mateixa sèrie, s'han representat a la figura 4.1A en relació als detectats en el ratolí Wt. Entre els diversos teixits estudiats del ratolí **Ald ko**, hem trobat **increments significatius** d'aquest compost a **cervell, medul.la espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal**. Els increments de C26:0 estan situats en un rang d'entre dues i vuit vegades, la qual cosa coincideix amb les dades publicades en altres estudis ^{250,251}. L'únic resultat que contrasta amb els anteriors és l'augment de C26:0 que hem observat a cervell (dues vegades respecte el Wt, figura 4.1), que és menor al descrit en animals de 3 mesos d'edat (5 vegades respecte el Wt) ²⁵¹. Aquesta discrepància podria ser deguda, almenys en part, a la diferència de fons genètic existent entre els ratolins utilitzats en un i altre estudi. Malgrat això, és important remarcar que els majors acúmul·s de C26:0 en el ratolí Ald ko els hem detectat a medul.la espinal (5 vegades respecte el Wt, figura 4.1), nervi ciàtic (6 vegades respecte el Wt, figura 4.1) i glàndula adrenal (8 vegades respecte el Wt, figura 4.1), fet que correlaciona amb el fenotip adrenomiloneuropàtic que acaba desenvolupant aquest animal ²⁵³.

(A) NIVELLS DE C26:0



(B) NIVELLS DE C24:0

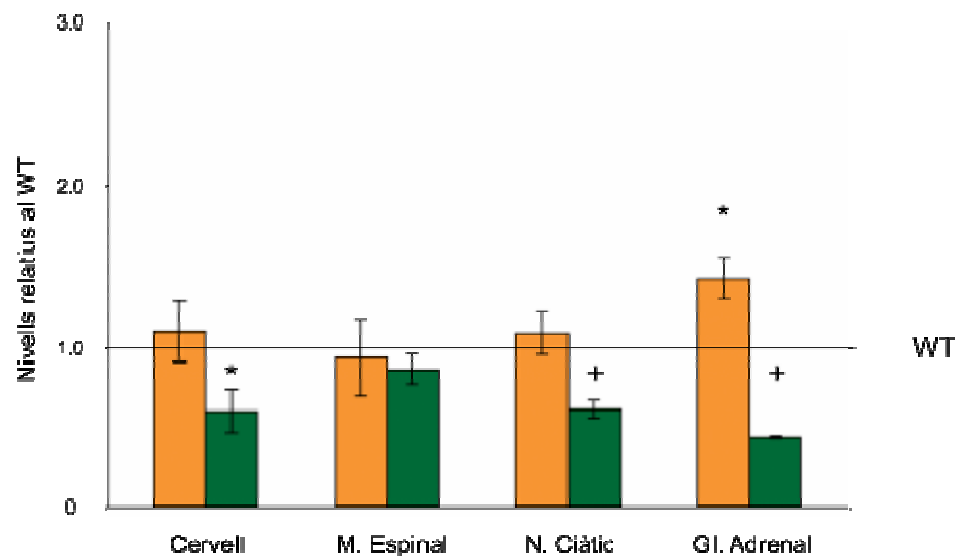


FIGURA 4.1. Nivells de C26:0 (A) i de C24:0 (B) en teixits procedents dels ratolins Ald ko i Ald/tg i expressats en relació als nivells obtinguts pel WT. Cada columna representa la mitjana±desviació estàndard de l'anàlisi de les mostres. Per a cervell i medulla espinal el nombre mínim de mostres analitzades per cada genotip és de 4. Cada mostra està constituïda per teixit procedent d'un sol animal. En el cas del nervi ciàtic i la glàndula adrenal, el mínim de mostres analitzades per genotip és de dues. Cadascuna d'elles reuneix els òrgans procedents de 4 animals. A fetge i a sèrum no s'han trobat diferències significatives per cap dels dos compostos, motiu pel qual no apareixen representades. Les diferències significatives respecte el WT s'han determinat a través d'ANOVA seguit del test de Fisher (valors de P: $p \leq 0.05$ (*) i $p \leq 0.01$ (**)) o bé a través del test de Wilcoxon (valors de P: $p \leq 0.05$ (+)).

Pel què fa a **fetge i sèrum, no hem detectat anomalies en els nivells d'aquest compost en el ratolí Ald ko** (per aquest motiu no s'han inclòs a la figura 4.1). Altres autors també havien destacat l'absència d'alteracions a sèrum com a un punt distintiu respecte els pacients X-ALD. En canvi, en el cas del fetge s'havien indicat augments d'aquest compost en el ratolí de tres mesos d'edat ²⁵¹. Un dels factors que podria explicar aquestes diferències, a més del fons genètic distintiu entre ratolins d'un i altre estudi, és l'alimentació que se'ls ha administrat. El fetge és un teixit que, degut a la seva funció, és molt sensible a les diferències en la composició de la dieta. Per això hem realitzat una anàlisi de la dieta subministrada als nostres ratolins per tal de saber-ne la composició d'àcids grassos (determinació d'esters de metil derivats a través de cromatografia de gasos). La composició d'aquesta dieta és rica en ω 9-MUFAs (44%) i ω 6-PUFAs (43%), mentre que els àcids grassos saturats de longitud major o igual a 18 carbonis i els ω 3-PUFAs són minoritaris (9% i 4%, respectivament). Dins dels ω 9-MUFAs, destaca l'alta proporció d'àcid oleic (C18:1 ω 9), que representa més del 95% del total de compostos de la sèrie dels ω 9-MUFAs analitzats a la dieta. Tal com hem comentat anteriorment, l'àcid oleic és capaç de disminuir els nivells de C26:0 en fibroblastes de pacients X-ALD quan és subministrat en el medi ¹²⁹, així com en sèrum de pacients quan es combina amb una dieta baixa en VLCFAs ^{217,218}. Tenint en compte això, la baixa presència d'àcids grassos saturats en la dieta subministrada als nostres ratolins, combinada amb la seva riquesa en àcid oleic, podrien explicar la manca d'alteracions observades en els nivells de C26:0 a fetge del ratolí Ald ko en les anàlisis que hem realitzat.

La **sobreexpressió d'*aldr (abcd2)* en el ratolí Ald ko corregeix els increments de C26:0 en tots els teixits on s'han detectat**, incloent tant els implicats com els no implicats en la patologia (veure figura 4.1A). En el cas de cervell i de nervi ciàtic s'observa una disminució significativa d'aquest compost respecte el Wt. La sobreexpressió d'*aldr (abcd2)* en els nostres ratolins transgènics, tal com hem indicat anteriorment, dóna lloc a un augment de l'expressió de la proteïna ALDRP en tots els teixits analitzats. Els augments d'expressió d'ALDRP, mesurats a través de Western blot, estan situats entre 5 i 10 vegades respecte els nivells detectats en teixits procedents del Wt ²⁵⁴. Així doncs, aquestes dades constitueixen la primera demostració, *in vivo*, que la sobreexpressió d'ALDRP (dins dels nivells esmentats) és capaç de corregir, per si sola, els increments patològics de C26:0 derivats de la

inactivació d'*ald*. Aquest fet reforça la candidatura d'aquesta estratègia com a possible teràpia per a la malaltia X-ALD.

1.2. NIVELLS DE C24:0 EN ELS RATOLINS ALD KO I ALD/TG.

En el ratolí **Ald ko** hem detectat un **increment petit però significatiu d'àcid lignocèric (C24:0) a la glàndula adrenal** (figura 4.1B), mentre que la resta de teixits presenten uns nivells normals d'aquest compost. Tot i que el C24:0 es mostra sovint alterat en sèrum de pacients i la relació C24:0/C22:0 és un paràmetre utilitzat en el diagnòstic de la malaltia, no s'havia descrit mai cap increment de C24:0 a ratolí. Aquest resultat posaria de manifest l'existència d'un altre substracte de la proteïna ALDP, però aquest aspecte serà abordat amb més detall a la propera secció.

La **sobreexpressió d'*aldr (abcd2)* en el ratolí Ald ko** condueix a una **disminució significativa del nivell de C24:0 a la glàndula adrenal** (figura 4.1B). També comporta una davallada d'aquest compost a cervell i a nervi ciàtic, fet que coincideix amb la reducció dels nivells de C26:0 descrita en l'apartat precedent. Aquests resultats demostren que els efectes de la sobreexpressió d'ALDRP (5-10 vegades respecte el Wt) no es restringeixen als nivells de C26:0, sinó que s'extenen als de compostos saturats de cadena més curta.

Amb aquest treball hem aconseguit establir una relació directa entre la sobreexpressió d'ALDRP i la davallada dels nivells de C26:0 i de C24:0 en teixits del ratolí Ald ko. Tal com hem comentat anteriorment, s'havia vist que l'administració de 4PBA en ratolins Ald ko donava lloc a una correcció parcial de l'acumulació de C26:0 en teixits diana de la malaltia, fet que correlacionava amb una inducció d'ALDRP i amb un increment de la proliferació peroxisomal. El problema d'aquesta experiència, però, és que no permetia de discriminar si l'efecte sobre els nivells de C26:0 és degut a la sobreexpressió d'ALDRP i/o als altres efectes del 4PBA ²¹⁴. Els resultats que hem presentat aquí demostren que la sobreexpressió d'ALDRP en el ratolí Ald ko és capaç de corregir-ne, *per se*, el fenotip bioquímic en tots els teixits analitzats, almenys als 8 mesos d'edat. A més, en estudis realitzats en paral·lel dins del nostre equip s'ha posat de manifest que, a 15 mesos o inclús més tard, el ratolí Ald/tg no presenta cap de les anormalitats histològiques observades en el ratolí Ald ko a nivell de medulla espinal, nervi ciàtic i glàndula adrenal ²⁵⁴. La conducció nerviosa a nervi ciàtic tampoc es mostra afectada en el ratolí Ald/tg. Les activitats exploratòries i la coordinació motora també es mantenen dins del rang de la normalitat en aquest ratolí. Així doncs, la

globalitat de tots aquests estudis posa de rellevància el gran abast preventiu que la sobreexpressió d'*aldr* posseeix sobre el fenotip causat per la deficiència d'ALDP.

Els resultats que acabem d'exposar demostren l'existència d'un cert grau de redundància funcional entre ALDP i ALDRP. Malauradament, però, la informació actual disponible sobre les funcions d'aquestes dues proteïnes és ben escàs. L'obtenció de més coneixements sobre ALDP i ALDRP és necessari per a l'elaboració d'una teràpia efectiva per a la malaltia X-ALD. Per aquest motiu hem realitzat un estudi, que presentem a continuació, per a conèixer millor el paper d'aquestes dues proteïnes en el metabolisme dels àcids grassos.

2. ESTUDI DEL PAPER D'ALDP I D'ALDRP EN EL METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

Per a l'estudi del paper d'ALDP i d'ALDRP en el metabolisme dels àcids grassos, ens hem beneficiat d'una sèrie de ratolins amb modificacions gèniques que afecten els gens codificadors d'aquestes dues proteïnes. A més del ratolí Ald ko, també hem pogut disposar dels ratolins Aldr ko i Ald/aldr ko. El ratolí Aldr ko presenta una inactivació del gen *aldr (abcd2)*, i el seu encreuament amb l'Ald ko ha donat lloc al ratolí mutant doble Ald/aldr ko²⁵⁴. De forma addicional, i en virtut de l'interès terapèutic que desperta la sobreexpressió d'*aldr (abcd2)*, també hem inclòs els ratolins Wt/tg i Ald/tg dins d'aquest estudi per tal de valorar-ne els efectes sobre el metabolisme dels àcids grassos.

Tots els animals tenien 8 mesos de vida en el moment dels experiments, d'acord a les raons exposades en la secció precedent. Els nostres estudis s'han centrat en diversos teixits procedents d'aquests ratolins, entre els quals hi figuren cervell, medul.la espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge. En les seccions següents es descriuen els resultats obtinguts en els estudis realitzats per esbrinar la funció d'ALDP i d'ALDRP. Aquests inclouen l'anàlisi dels nivells d'expressió de tots els membres coneguts de la família de transportadors ABCD, la composició en àcids grassos pertanyents a diferents sèries i l'anàlisi del nivell d'expressió de gens implicats en el metabolisme d'aquests compostos.

2.1. NIVELL D'EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS ABCD EN TEIXITS MURINS.

La família dels transportadors ABCD, tal com hem comentat anteriorment, està formada per 4 proteïnes: ALDP, ALDRP, PMP70 i PMP69. Aquestes proteïnes tenen un alt grau de similitud de seqüència a nivell d'aminoàcid (percentatge d'identitat a nivell d'aminoàcid respecte a ALDP: ALDRP 66%, PMP70 38% i PMP69 27%)¹⁸⁸. Aquest fet suggereix l'existència d'un cert solapament funcional entre elles. Prenent aquesta hipòtesi com a base, la pèrdua o la sobreexpressió d'un transportador ABCD (com succeeix en els diferents ratolins mutants estudiats) podria conduir a una modificació del nivell d'expressió dels altres membres d'aquesta família, com a mecanisme de compensació. L'existència d'una correlació d'aquestes característiques indicaria que l'organisme es capaç de detectar i corregir l'alteració d'un transportador. Per això hem analitzat els nivells d'expressió dels gens codificadors dels transportadors ABCD en teixits de tots els ratolins mutants.

La tècnica utilitzada per a dur a terme aquest estudi és la RT-PCR quantitativa. L'expressió dels transportadors ABCD a nivell de mARN ha estat determinada a cervell, medulla espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge, de tots els ratolins mutants. Per a cada mostra d'ARN s'han mesurat per duplicat els nivells d'expressió dels gens *abcd* així com el del gen d'expressió ubiqüitària *hprt* (hypoxanthine phosphoribosyl transferase). El valor mitjà d'expressió de cada un dels gens *abcd* ha estat normalitzat amb el del gen *hprt*. En les mostres de genotips mutants s'ha exclòs l'anàlisi del corresponent gen *abcd* manipulat.

L'avantatge de la RT-PCR quantitativa és la determinació del cicle exacte en el qual comença la fase exponencial d'amplificació del fragment de cADN (C_T). Aquest fet ens permet de comparar els nivells d'expressió dels gens *abcd* dins d'un mateix teixit. Això és el que s'il·lustra a la figura 4.2, per a la qual s'han utilitzat les dades obtingudes a través de l'anàlisi de les **mostres procedents del Wt**. Per a cada teixit hem referit les dades dels gens *abcd* a la del gen control *hprt* a través de la substracció $N = C_T \text{ mitjà } hprt - C_T \text{ mitjà } \text{gen } abcd$. La diferència en el nivell d'expressió de cada gen respecte a *hprt* (nivell normalitzat d'expressió del gen problema) vé determinada per la fórmula exponencial 2^N , i s'han representat per a cada teixit a la figura 4.2.

Els quatre transportadors ABCD estan expressats en tots els teixits analitzats, tal com s'observa a la figura 4.2. Els gens *aldr* (*abcd2*) i *pmp70* (*abcd3*) són els més expressats a cervell, medulla espinal i nervi ciàtic. En teixits extraneurals com la glàndula adrenal i el fetge, *pmp70* (*abcd3*) és el més expressat dels quatre gens *abcd*. Per a cada teixit, hem calculat la relació existent entre els nivells normalitzats d'expressió dels gens *abcd* (valors 2^N , representats a la figura 4.2), assignant el valor de 1 al gen menys expressat (taula 4.1). D'aquesta manera s'observa, per una banda, que la glàndula adrenal és l'únic teixit on els nivells d'expressió d'*ald* (*abcd1*) i d'*aldr* (*abcd2*) són comparables, amb una relació de 1:2. Per altra banda, en teixits neurals es posa de manifest una diferència en la relació existent entre els nivells d'expressió d'*ald* (*abcd1*) i de *pmp69* (*abcd4*), els gens menys expressats en aquests teixits. A cervell i nervi ciàtic, la relació entre els nivells d'expressió d'*ald* i de *pmp69* és de 1:6 i 1:3, respectivament, mentre que a medulla espinal la relació s'igualava (1:1).

En l'anàlisi del nivell d'expressió (mARN) dels gens que codifiquen pels transportadors ABCD en teixits dels **ratolins mutants Ald ko, Aldr ko, Ald/aldr ko i Wt/tg**, no s'han detectat diferències significatives respecte el Wt. Això indica que la

TRANSPORTADORS PEROXISOMALS

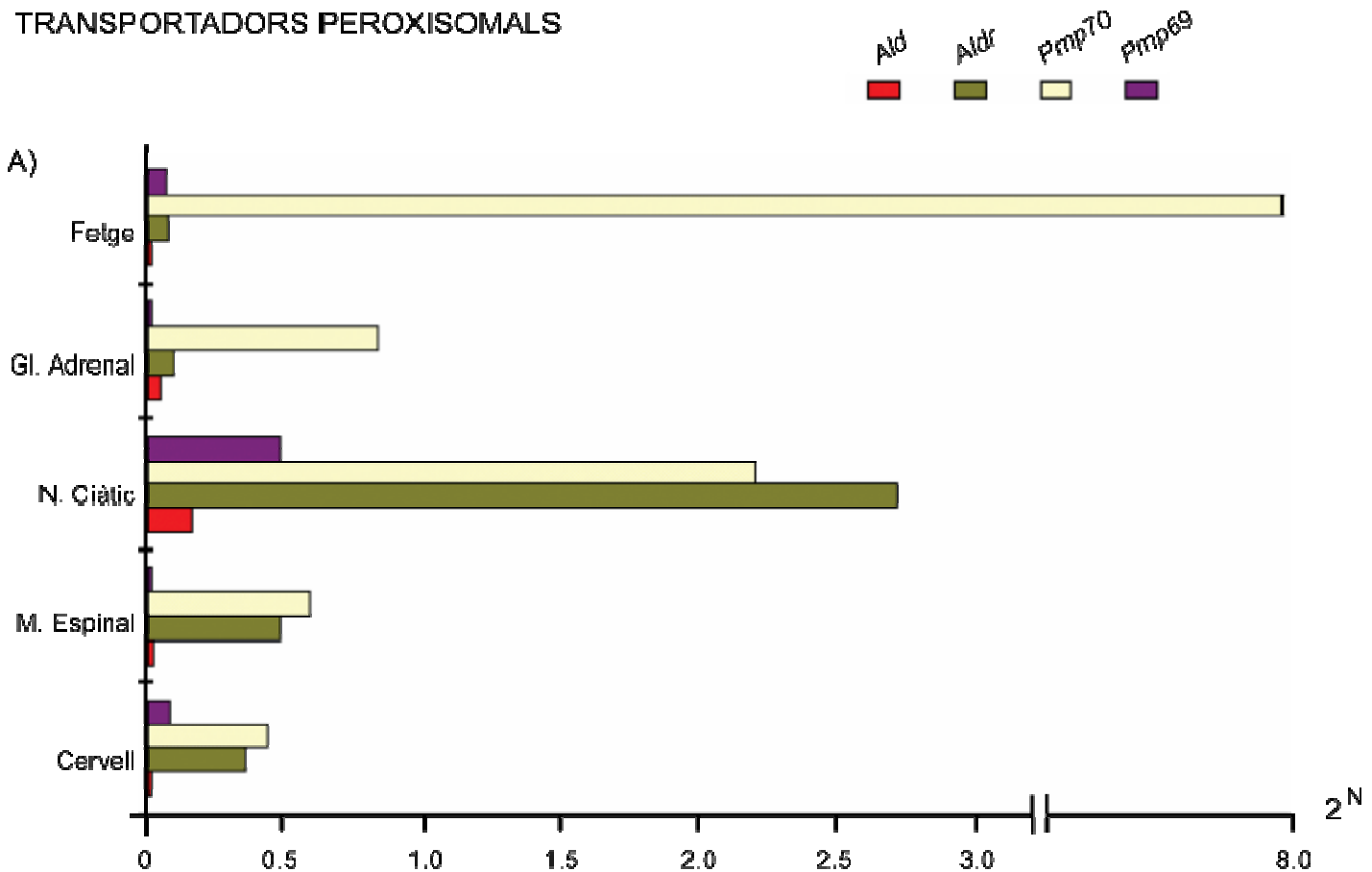


FIGURA 4.2. Nivells d'expressió dels transportadors ABCD a cervell, medul·la espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge del ratolí Wt. Aquests nivells s'han determinat a través del cicle mitjà d'amplificació obtingut per RT-PCR quantitativa. Cada columna representa el nivell d'expressió de cada 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.

B)	ald	aldr	pmp70	pmp69
FETGE	1	5	500	4
GL. ADRENAL	3	6	54	1
N. CIÀTIC	1	17	14	3
M. ESPINAL	1	31	38	1
CERVELL	1	22	28	6

TAULA 4.1. Expressió intratissular relativa dels gens codificadors dels transportadors ABCD. Les relacions s'han establert a partir dels valors 2^N de cada gen, representats a la figura 4.1 (N=cicle d'amplificació mitjà d'hprt - cicle d'amplificació mitjà 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, medul·la espinal, nervi ciàtic, glàndula adrenal i fetge.

inactivació o la sobreexpressió d'un dels membres d'aquesta família de transportadors no afecta l'expressió, almenys a nivell transcripcional, de la resta. De tota manera seria important de verificar aquests resultats a nivell proteic per descartar l'acció de mecanismes post-transcripcionals de regulació de l'expressió.

Els nostres resultats sobre l'absència d'alteracions en l'expressió dels transportadors de la família ABCD en teixits del ratolí Ald ko coincideixen amb els d'altres autors ¹⁸¹. A més, són d'especial rellevància després de la publicació d'un estudi recent en pacients on es posa de manifest una correlació entre el nivell d'expressió (mARN) del gen *ABCD4* en zones sanes de la matèria blanca del cervell i el grau de severitat de la malaltia ²⁵⁷. En concret, els nivells de mARN del gen *ABCD4* en aquest teixit es troben reduïts 2.9 vegades en pacients CCALD, 2.2 vegades en pacients AMN amb afectació cerebral i només 1.6 vegades en pacients AMN sense afectació cerebral (diferències determinades respecte a individus control). El fet que no haguem detectat uns nivells anòmals d'expressió del gen *abcd4* en el ratolí Ald ko pot obeir a diverses causes: i) a l'anàlisi d'un homogenat total de cervell. En pacients, les diferències han estat trobades exclusivament a la matèria blanca del cervell. ii) L'estret marge de diferència existent en el nivell d'expressió del gen *ABCD4* entre controls i pacients AMN sense afectació cerebral, que és el fenotip que mimetitzava el ratolí Ald ko, iii) les diferències existents entre espècies.