Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Paper de RIP140 en la fisiopatogenia de la adrenoleucodistròfia lligada a l'X.

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom
LAIA

Cognoms
MORATO FORNAGUERA

Correu electrònic
lmorato@idibell.cat

Dades del director del projecte

Nom
AURORA

Cognoms
PUJOL ONOFRE

Correu electrònic
apujol@idibell.cat

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat

IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge)
Gran Via s/n Kim. 2,7
08097 L'Hospitalet de Llobregat

Número d'expedient
2009FI_B 00340

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Adrenoleucodistròfia lligada a l'X (X-ALD),model ratolí Abcd1- , àcid hexacosanoic (C26:0), RIP140, disfunció mitocondrial

Data de presentació de la justificació
21/08/09

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació, Universitats i Empresa

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

La adrenoleucodistrofia ligada al X (X-ALD) es un enfermedad neurometabólica fatal caracterizada por una desmielinización cerebral progresiva infantil (CCALD) o por una neurodegeneración de la médula espinal (adrenomieloneuropatía, AMN), insuficiencia adrenal y acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML) como el ácido hexacosanoico (C26:0) en tejidos. La enfermedad está causada por mutaciones en el gen ABCD1 el cual codifica para un transportador peroxisomoal que importa AGCML. El ratón knockout para Abcd1 (Abcd1-) desarrolla alteraciones en la médula espinal que mimetizan el modelo de enfermedad AMN con inicio de los síntomas a los 20 meses. Previamente, nuestro grupo evidenció mediante análisis de transcriptómica, una desregulación mitocondrial en el modelo murino Abcd1- . En este trabajo demostramos que tanto en el ratón Abcd1- como en la sustancia blanca afectada de pacientes X-ALD hay una depleción mitocondrial. Para poder explicar esta depleción, estudiamos los niveles de un repressor de la biogenesis mitocondrial, RIP140. En cultivo organotípico de cortes de médula espinal observamos un aumento de los niveles proteicos de RIP140 en el ratón Abcd1- y también un aumento mediado por C26:0. Estos resultados indican que la sobreexpresión de RIP140 puede ser la responsable de la depleción mitocondrial presente en el ratón Abcd1- y una posible nueva diana terapèutica para la X-ALD.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a fatal neurodegenerative and metabolic disorder, characterized by progressive cerebral demyelination cerebral childhood adrenoleukodystrophy (CCALD) or spinal cord neurodegeneration (adrenomyeloneuropathy, AMN), adrenal insufficiency and accumulation of very long-chain fatty acids (VLCFA) as hexacosanoic acid (C26:0). The disease is caused by mutations in the ABCD1 gene, which encodes a peroxisomal transporter that plays a role in the import of VLCFA into peroxisomes. The Abcd1 knockout mice develop a spinal cord disease that mimics AMN in adult patients, with late onset at 20 months of age. Previously, our group showed a mitochondrial disregulation in Abcd1-mice by transcriptomical analysis. In this work, we demonstrate a mitochondrial depletion in both Abcd1- mice and affected white matter from X-ALD patients. In order to explain this depletion, we analyzed the levels of a mitochondrial biogenesis repressor, RIP140. In Abcd1- mice organotypic spinal cord slice culture we observed an increase in protein levels of RIP140 and also a C26:0 mediated increase. These results point to RIP140 as possibly responsible of mitochondrial depletion found in Abcd1-mice and a new therapeutic target for X-ALD.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

INTRODUCCIÓN

La **adrenoleucodistrofia ligada al X** (X-ALD, McKusick 300100) es una enfermedad monogénica **neurometabólica**, frecuentemente letal y caracterizada por una **desmielinización** progresiva con **daño axonal** del sistema nervioso central y periférico, insuficiencia adrenal y **acumulación de ácidos grasos** saturados de cadena muy larga (AGCML) como el ácido hexacosanoico (**C26:0**). Se trata de una enfermedad rara cuya incidencia no supera 1/17.000 varones y una de les enfermedades peroxisomales mas frecuentes. Los dos fenotipos neurológicos principales son la forma severa cerebral infantil (CCALD) rápidamente progresiva y asociada a una respuesta inflamatoria en la sustancia blanca cerebral y la adrenomieloneuropatia (AMN) que progresa lentamente, afecta adultos y presenta axonopatía distal en medula espinal y neuropatía periférica. Los distintos fenotipos clínicos pueden presentarse en la misma familia indicando que no existe correlación genotipo-fenotipo (1). La enfermedad está causada por mutaciones en el gen que codifica por el **transportador peroxisomal Abcd1**, quien se encarga de importar estos AGCML al peroxisoma para su degradación (2). La mutación en el transportador provoca una perdida de función de la proteína con una consiguiente acumulación de AGCML en plasma, así como en tejidos diana tales como el SNC y glándulas suprarrenales. Sus niveles elevados se consideran patognomónicos y constituyen la herramienta diagnóstica por excelencia (1). Los mecanismos moleculares subyacentes a la neurodegeneración son desconocidos, y en la actualidad no se dispone de tratamientos eficaces; únicamente los niños asintomáticos pueden beneficiarse de un trasplante alogénico de medula ósea (3). Para estudiar las bases moleculares de la fisiopatogenia de la enfermedad se generó un ratón deficiente en el gen Abcd1 (***Abcd1***). Este ratón presenta un fenotipo neurodegenerativo tardío que recuerda a la AMN con degeneración axonal en la médula espinal, ralentización de la velocidad de conducción nerviosa periférica y afectación psicomotora, con inicio de la clínica a los 20 meses de edad (4, 5, 6). Recientemente nuestro grupo puso en evidencia que el **estrés oxidativo** es un elemento muy precoz y clave en la fisiopatogenia de la enfermedad, ya observable a los tres meses de edad. Además, se demostró por primera vez que el exceso de C26:0 genera este tipo de lesiones (7).

OBJETIVOS

La comprensión de la etiopatogénesis de la X-ALD es un prerrequisito para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Un primer análisis de transcriptómica del modelo murino Abcd1$^-$ demostró desregulación de la mitocondria y de las vías de estrés oxidativo en etapas muy anteriores a las lesiones tisulares. Los objetivos de este trabajo son:

- Demostrar la presencia de depleción mitocondrial en pacientes X-ALD
- Confirmar los resultados obtenidos en los análisis de transcriptómica que implican desregulación mitocondrial en el ratón Abcd1$^-$, elucidar a que edad se producen estos cambios e identificar el mecanismo molecular subyacente a la disfunción mitocondrial

RESULTADOS

1. Depleción mitocondrial en sustancia blanca afectada de pacientes X-ALD.

En el modelo de ratón X-ALD hemos evidenciado una depleción mitocondrial del 50%, tal como se deduce de los resultados obtenidos por análisis de microarrays, mRNA y proteína. Para verificar si nuestros resultados en ratón son extrapolables a la enfermedad humana repetimos el experimento con muestras de pacientes ALD. En colaboración con el doctor Patrick Aubourg del "Service d'endocrinologie et de neurologie pédiatrique Hospital Saint-Vincent-de-Paul" de París, analizamos muestras de tejido cerebral, sustancia blanca afectada (placa de desmielinización) y sustancia blanca de la zona intacta de nueve pacientes ALD, tanto CCALD (5) como AMN (4), así como 18 muestras de individuos sanos. Mediante experimentos de WB observamos una represión de la expresión del complejo OXPHOS I de la cadena respiratoria de la mitocondria, tanto de la subunidad codificada por el núcleo (NDUAF9), como la subunidad codificada por la mitocondria (ND6); así como la porina VDAC comparada con el control de carga gamma tubulina en el tejido afectado del cerebro de

pacientes ALD, tanto CCALD como AMN (**Figura 1A**). Confirmamos estos resultados mediante PCR cuantitativa (mtDNA/nDNA) (**Figura 1B**). Nuestros resultados demuestran por primera vez la existencia de una depleción en la mitocondria en pacientes ALD. Y demostramos nuevamente similitudes entre el fenotipo en el ratón *Abcd1*$^{-}$ y el fenotipo en el humano.

2. Mecanismos moleculares de la depleción mitocondrial en X-ALD: RIP140.

El principal regulador de la biogénesis mitocondrial, PGC1α (*PPAR gamma coactivator 1α*) y sus dianas NRF1, NRF2, TFAM, TFB1M, TFB2M no están diferentemente expresadas en el ratón X-ALD (datos no mostrados).

Estudios recientes en adipocitos, la depleción del correpresor ligando dependiente **RIP140** (*Receptor interacting protein 140*) provocaba una inducción de muchos de los genes que codifican para encimas involucrados en el ciclo de Krebs, glicólisis, oxidación de los ácidos grasos, fosforilación oxidativa y biogénesis mitocondrial. Asimismo cuando RIP140 estaba inducido en estos adipocitos el mismo cluster de genes estaba reprimido (8). Dicho cluster de genes controlado por RIP140 está significativamente desregulado en estudios de microarrays de nuestro modelo (análisis GSEA) (datos no mostrados).

Con estos antecedentes hemos analizado niveles de expresión proteica de RIP140 en médula espinal de ratón *Abcd1*$^{-}$ a diferentes edades. Observamos un aumento de RIP140 a siete días que concuerda con una disminución de la mitocondria a los 18 días tal como se observa en los análisis por western blot del complejo OXPHOS I de la cadena respiratoria (NDUAF9) así como la porina VDAC (**Figura 2**).

De igual forma, estudiamos en nuestro modelo *exvivo* de organotípicos de médula espinal de ratón X-ALD el posible efecto de los VLCFA sobre RIP140. Observamos un aumento de RIP140 directamente proporcional a la concentración de C26:0 en el medio de cultivo (**Figura 3**).

CONCLUSIÓN: Estos datos indican que RIP140 puede ser un buen candidato para controlar la inhibición de la biogénesis mitocondrial en el ratón X-ALD, y por tanto, una buena diana terapéutica para la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Muestras humanas.

Las muestras de tejido cerebral, sustancia blanca afectada (placa de desmielinización) y sustancia blanca de la zona intacta de nueve pacientes ALD, tanto CCALD (n=5) como AMN (n=4), así como 18 muestras de individuos sanos fueron cedidas por el Dr. Patrick Aubourg del "Service d'endocrinologie et de neurologie pédiatrique Hospital "Saint-Vincent-de-Paul" de París.

2) Muestras de ratón.

La generación y el genotipado del ratón ***Abcd1***$^{-}$ ha sido descrito anteriormente (4,5,6). Todos los protocolos utilizados en este trabajo fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal en el Institut d´Investigació Biomédica de Bellvitge en las instalaciones acreditadas por la "Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Internacional".

3) Cultivo de organotípicos de médula espinal.

Preparamos el cultivo de organotípicos de muestras de médula espinal de ratones de 18 días de vida siguiendo el método anteriormente descrito (7). Brevemente, tras el sacrificio procedimos a la disección del animal y obtención de la médula espinal eliminando tanto los ganglios basales como las meninges. Una vez obtenida, la médula espinal se cortó en secciones finas transversales de 350 µm utilizando el Tissue Chopper (McIlwain). Transferimos las secciones a una solución estéril (Grey´s balanced Salt solution, GBSS), seleccionamos las rodajas no dañadas durante el proceso de disección y las cultivamos en membranas "30-mm Millipore Millicell-CM" de 0.4 µm de poro, 3-4 rodajas por membrana. Introducimos las membranas en placas de seis pocillos (NUNC) con 1 mL de medio (50% MEM con Earl´s balanced salt solution EBSS y glutamina, 25% Hank´s balanced salt solution y 25% horse serum suplementado con 20 mM de Hepes y D-Glucosa (6 mg/mL). Incubamos a 37ºC/5% CO_2 cambiando el medio cada 3 días. A las dos semanas de cultivo tratamos con C26:0 100 µM durante tres días.

4) Electroforesis y Western Blot.

Homogenizamos mecánicamente las muestras (médula espinal, cultivo de organotípicos y tejido cerebral humano) en tampón RIPA (50 mM Tris pH 8, Ácido Deoxycholic 12 mM, NaCl 150 mM, 1% NP40 con inhibidores de proteasas y fosfatasas) y sonicamos. Centrifugamos 5 minutos a 1000g. Posteriormente cuantificamos la cantidad de proteína mediante el método BCA (Biorad).

Para la inmunodetección después de la electroforesis transferimos las proteínas mediante el Mini Trans-Blot Transfer Cell (BioRad) a membranas de Nitrocelulosa (PROTRAN). Posteriormente incubamos las membranas ON a 4ºC con los anticuerpos anti-mouse OXPHOS I (NDUFA9 1:1000), anti-mouse ND6 subunit OXPHOS I (1:1000), anti-mouse Vdac "porina 31 HL"(1:5000) de Molecular probes; anti-rabbit RIP140 (1:150) de Santa Cruz, anti-mouse Y-Tubuline (1:10000) de Sigma y anti-rabbit. Finalmente incubamos las membranas con el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse o Goat Anti-Rabbit (1:30000-1:50000).

FIGURAS

Figura 1.

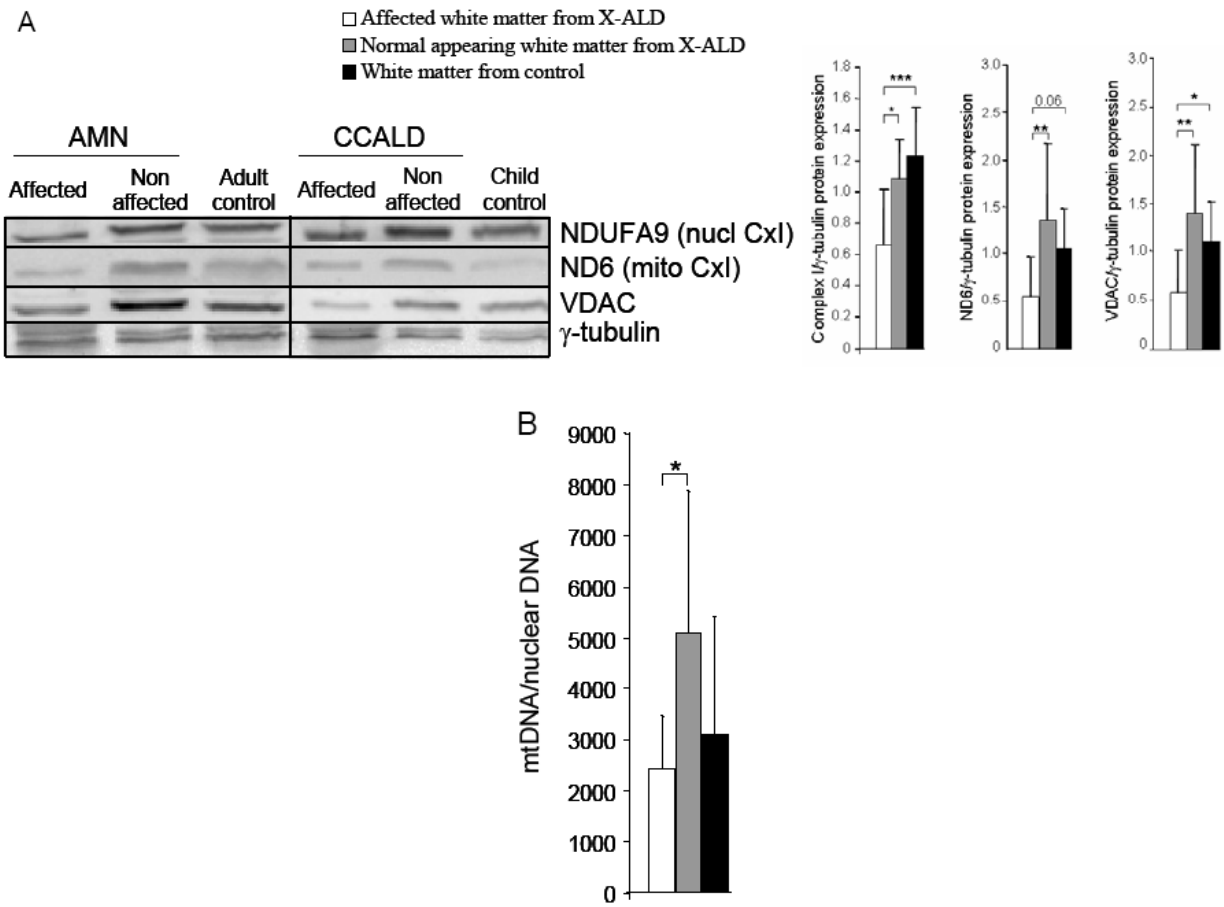


Figura 2.

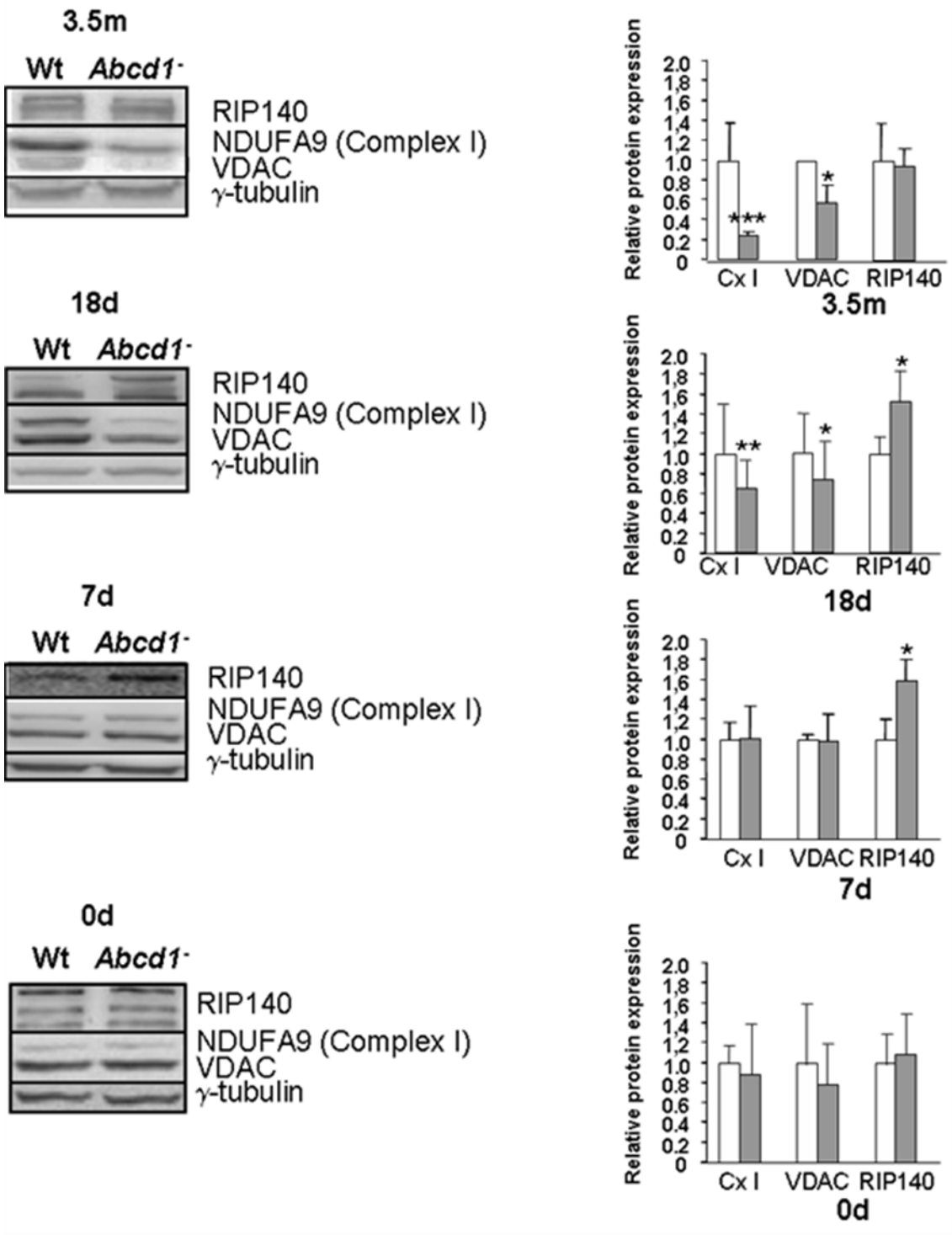
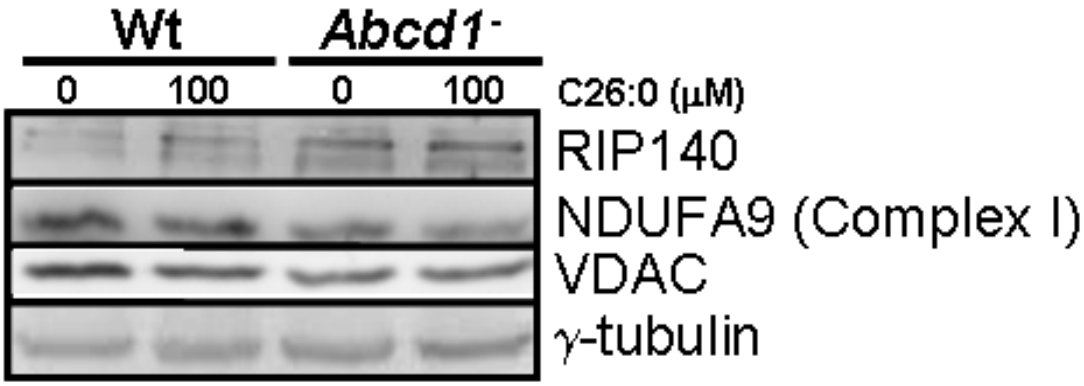

3.5m
Wt
Abcd1-
RIP140
NDUFA9 (Complex I)
VDAC
γ-tubulin
18d
Wt
Abcd1-
RIP140
NDUFA9 (Complex I)
VDAC
γ-tubulin
7d
Wt
Abcd1-
RIP140
NDUFA9 (Complex I)
VDAC
γ-tubulin
0d
Wt
Abcd1-
RIP140
NDUFA9 (Complex I)
VDAC
γ-tubulin
Relative protein expression
2.0
1,8
1,6
1,4
1,2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Cx I
VDAC
RIP140
3.5m
18d
7d
0d

Figura 3.


Wt
Abcd1-
0
100
0
100
C26:0 (μM)
RIP140
NDUFA9 (Complex I)
VDAC
γ-tubulin

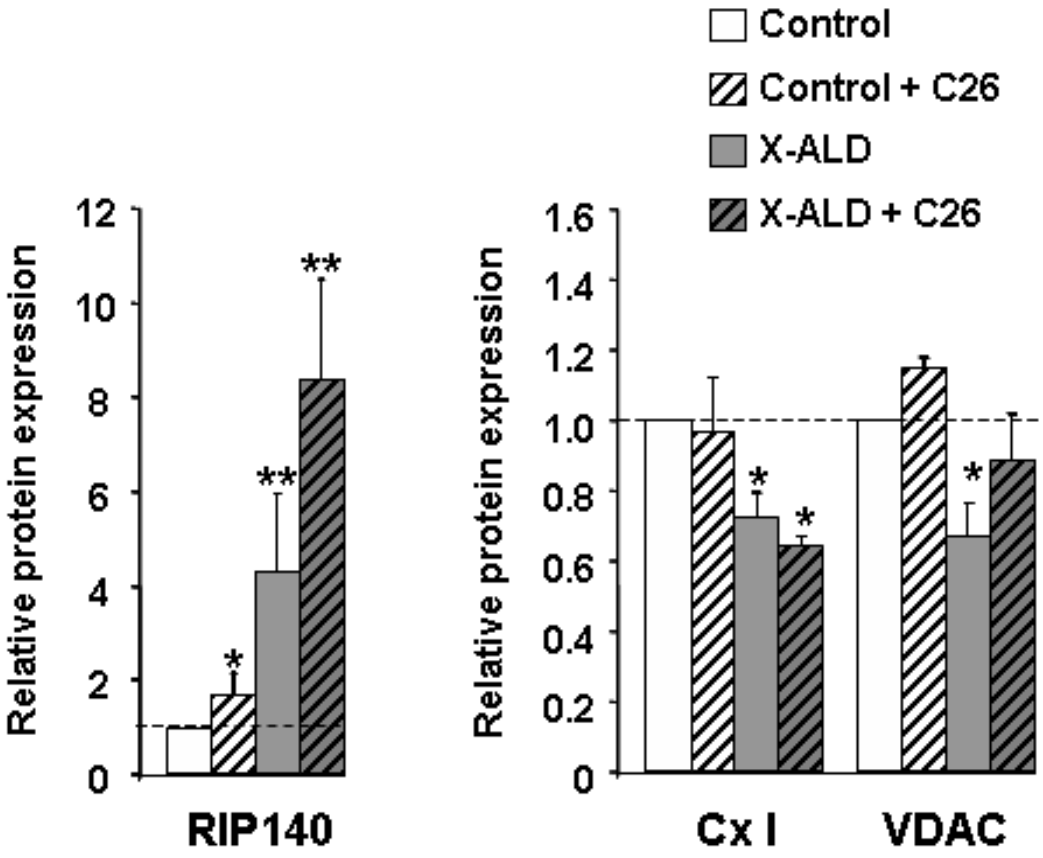

Control
Control + C26
X-ALD
X-ALD + C26
Relative protein expression
12
10
8
6
4
2
0
*
**
**
RIP140
Relative protein expression
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
*
Cx I
VDAC

Figura 1. Niveles de NDUFA9 (subunidad del complejo I codificado por el núcleo), ND6 (subunidad del complejo I codificado por la mitocondria), VDAC (porina mitocondrial) (A) y DNA mitocondrial (mtDNA) (B) en sustancia blanca afectada y no afectada de pacientes CCALD y AMN así como individuos sanos niños y adultos. Los WB para monitorizar los niveles de NDUFA9, ND6 y VDAC han sido realizados en homogenizado total de sustancia blanca (niños sanos (n=10), adultos sanos (n=12), tejido afectado AMN (n=5) y no afectado AMN (n=5), tejido afectado CCALD (n=4) y no afectado CCALD (n=4). Se muestran los WB representativos. Los niveles de proteína están normalizados con el control interno de carga γ-tubulina. El contenido de mtDNA está expresado como el ratio entre mtDNA y DNA nuclear.

Las diferencias significativas han sido determinadas mediante una ANOVA seguida de un test post-hoc Tukey HSD ($p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**)).

Figura 2. Niveles de NDUFA9 (subunidad del complejo I codificado por el núcleo), ND6 (subunidad del complejo I codificado por la mitocondria), VDAC (porina mitocondrial) en médula espinal de ratón Abcd1$^-$ a diferentes edades. Los WB para monitorizar los niveles de NDUFA9, ND6 y VDAC han sido realizados en homogenizado total de médula espinal (n=4-6 para todas las edades). Se muestran los WB representativos. Los niveles de proteína están normalizados con el control interno de carga γ-tubulina. Las diferencias significativas han sido determinadas mediante una ANOVA seguida de un test estadístico post-hoc Tukey HSD ($p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**)).

Figura 3. Niveles de RIP140, NDUFA9 (subunidad del complejo I) y VDAC (porina mitocondrial) en cultivo de organotípicos de médula espinal (OSCSC) de ratón Wt y Abcd1$^-$ y efecto del C26:0 en el medio. Los WB para monitorizar los niveles de RIP140, NDUFA9 y VDAC han sido realizados en homogenizado total de cultivo de organotípicos de médula espinal (OSCSC) de ratón Wt (n=6) y *Abcd1*$^-$ (n=6). Se muestran los WB representativos. Los niveles de proteína están normalizados con el control interno de carga γ-tubulina. Las diferencias significativas han sido determinadas mediante una ANOVA seguida de un test estadístico post-hoc Tukey HSD ($p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) y $p \leq 0.001$ (***).

BIBLIOGRAFIA

(1) Moser H.W. 2001. X-linked adrenoleukosysrophy. In Scriver CR., Beaudelet AL et al. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York. pp. 3257-3302.

(2) van Roermund CW, Visser WF, Ijlst L, van Cruchten A, Boek M, Kulik W, Waterham HR, Wanders RJ. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. FASEB J 2008;22(12):4201-8.

(3) Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. Blood 2004 Aug 1;104(3):881-8.

(4) Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. Hum Mol Genet. 2002 Mar 1;11(5):499-505.

(5) Pujol A, Ferrer I, Camps C, Metzger E, Hindelang C, Callizot N, Ruiz M, Pàmpols T, Giròs M, Mandel JL. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. Hum Mol Genet. 2004 Dec 1;13(23):2997-3006.

(6) Ferrer I, Kapfhammer JP, Hindelang C, Kemp S, Troffer-Charlier N, Broccoli V, Callyzot N, Mooyer P, Selhorst J, Vreken P, Wanders RJ, Mandel JL, Pujol A.Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage.Hum Mol Genet. 2005 Dec 1;14(23):3565-77.

(7) Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroya F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Pujol A. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. Hum Mol Genet. 2008 Jun 15;17(12):1762-73.

(8) Aimee M. Powelka, Asha Seth, Joseph V. Virbasius, Evangelos Kiskinis, Sarah M. Nicoloro et al. Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. J. Clin. Invest. 2005. 116(1): 125-136.