



Fundació
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM
Diabetis i Obesitat



RELLEVÀNCIA DEL CLÚSTER miR-424(322)/503 EN EL DESENVOLUPAMENT D'UN TEIXIT ADIPÓS HIPERPLÀSTIC

Francisco José Ortega Delgado

Hospital Dr. Josep Trueta - IDIBGi Institut d'Investigació Biomèdica de Girona

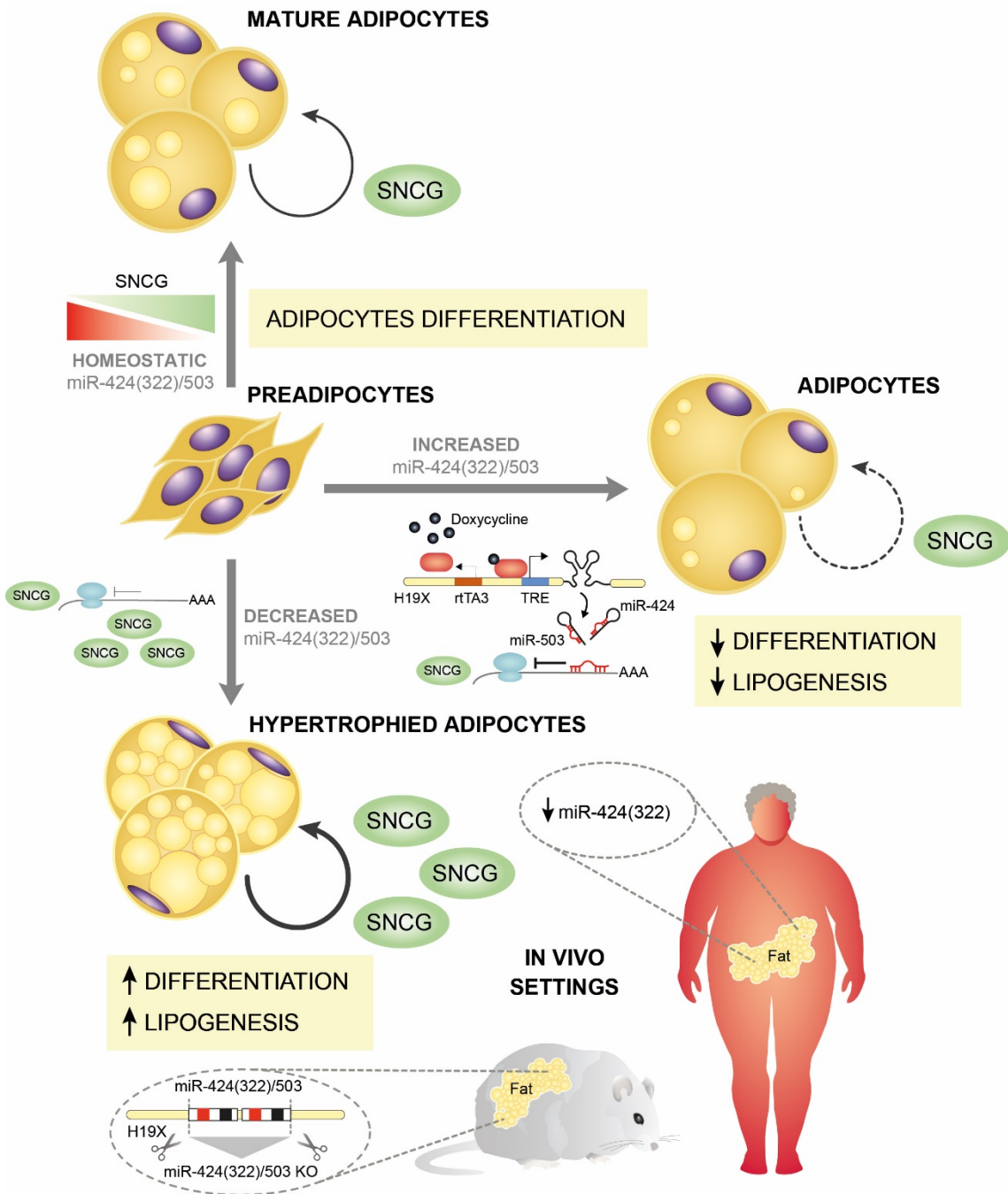
David Llobet Navas

IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica de BellvitgeIDIBELL

1. Resum

Mitjançant un model de ratolins modificats genèticament per entendre millor la fisiologia de l'epiteli mamari, es va observar una relació causal entre el clúster miR-424(322)/503 i el desenvolupament d'un teixit adipós hiperplàstic, fet que va promoure l'aparició d'un fenotip obès. Partint d'aquesta serendipitat, el nostre projecte es va estructurar en objectius destinats a inspeccionar la rellevància del clúster miR-424(322)/503 en i per a la diferenciació (adipogènesi) i el comportament de les cèl·lules adiposes (adipòcits) que formen els dipòsits de greix. L'estudi demostra que aquest parell de miRNA constitueix un eix regulador fonamental per a l'expansió del teixit adipós. La pèrdua d'aquests elements genètics en ratolins provoca obesitat, a mesura que augmenta el nombre de cèl·lules progenitores i la presència d'adipòcits hipertrofiats. Mitjançant models experimentals complementaris i la seqüenciació massiva d'adipòcits alterats, demostrem que el clúster miR-424(322)/503 regula un programa genètic altament conservat i íntimament relacionat amb la diferenciació i l'activitat de la cèl·lula adiposa. Pel que fa a la mecànica, les nostres troballes apunten que la principal diana d'aquesta acció miRNA és la γ -sinucleïna (SNCG), un factor de secreció que, aparentment, pot promoure la reordenació del programa genètic mitjançant el control de funcions essencials als adipòcits, la qual cosa afavoreix la naturalesa expansiva dels dipòsits de greix. En conseqüència, la disminució del clúster miR-424(322)/503 en ratolins i persones obesas comporta un augment sostingut de la SNCG al greix i la sang perifèrica, característiques inherents d'un fenotip obès que poden explicar certes comorbiditats i ser corregides mitjançant una pèrdua significativa de pes, segons les nostres troballes en humans. En conjunt, aquest estudi revela un mecanisme que regula l'expansió de la massa grassa fins ara desconegut i estretament controlat pel clúster miR-424(322)/503 a través de l'SNCG que expressen i segreguen les cèl·lules adiposes dels dipòsits de greix corporal.

Resum gràfic



2. Resultats

Impacte biològic i novetat. Des de l'any 1993, i amb el descobriment del primer miRNA al nematode *Caenorhabditis elegans*, el nombre, funció i rellevància biològica dels miRNA ha augmentat exponencialment en gairebé tots els camps científics: des del control del desenvolupament de les fulles i les flors fins a la reproducció humana, passant pel càncer i les malalties degeneratives, entre d'altres. Tanmateix, les implicacions biològiques i el potencial d'aquestes cadenes curtes d'àcids ribonucleics no codificants s'han vist sovint obstaculitzades per la incapacitat de (i) superar la bretxa de la seva conservació entre espècies, (ii) traslladar coneixements experimentals i mecanicistes *in vitro* a un context *in vivo*, per exemple, fent ús de modificacions genètiques en organismes complexos, i (iii) definir la rellevància fisiològica i clínica en humans, mitjançant l'exploració de mostres biològiques derivades de pacients i voluntaris sans. En aquest estudi pioner combinem els tres elements en un sol treball en què demostrem que el recent gen supressor de tumors mamaris, el clúster miR-424(322)/503, suposa un nou mecanisme de control homeostàtic a les cèl·lules precursoras d'adipòcits, relacionat també amb el compromís i l'activitat d'aquestes cèl·lules paradigmàtiques i l'expansió del teixit adipós en mamífers.

La recerca en context. Els descobriments compilats el llarg d'aquest estudi aporten llum a un procés molecular, cel·lular i fisiològic extremament complex i important, com és el desenvolupament d'un teixit adipós hiperplàstic. En temps en què la tendència a l'obesitat descriu un augment sostingut en pràcticament tots els països del món, la identificació i exploració dels mecanismes que permeten l'adipogènesi i l'expansió concomitant dels dipòsits de greix corporal poden incloure avenços sense precedents en el camp de la nutrició i l'endocrinologia clínica. A través d'aquest treball, proporcionem a la comunitat científica un nou mecanisme de regulació molecular i genètic que ens apropa a aquests objectius cardinals en salut pública, mentre amplia el nostre coneixement en aquesta àrea de la investigació biomèdica i l'estudi de malalties altament prevalents, com són totes les relacionades amb l'obesitat.

Resultats. Hem fet contribucions seminals que ajudaran a comprendre millor els sistemes que regulen la diferenciació de cèl·lules progenitores i el comportament dels adipòcits que constitueixen una part integrant dels dipòsits de greix en mamífers. Se'n deriva una nova visió d'aspectes cabdals dins l'obesitat i els factors solubles que són

alliberats per aquestes cèl·lules paradigmàtiques. En concret, la γ -sinucleïna (SNCG), també coneguda com a *gen específic del càncer de mama 1* (BCSG1), podria constituir una forma de senyalització autoparacrina desconeguda fins ara, responsable de la retroalimentació i les comorbiditats comunament vinculades a un fenotip obès. Ateses les funcions relacionades amb el càncer que s'atribueixen als gens revelats per aquest treball (és a dir, tant el clúster miR-424(322)/503 com la seva principal diana al teixit adipós, SNCG/BCSG1), els resultats derivats d'aquest estudi suggereixen vies que podrien explicar la relació àmpliament establerta entre l'obesitat i la incidència més alta d'alguns tipus de càncer. En conseqüència, hem engegat noves línies experimentals i la recerca de fons de finançament addicionals que ens permetin explorar aquesta hipòtesis de treball i l'extrapolació necessària d'uns resultats que, en conjunt, subratllen la importància d'aquests miRNA en un context clínic.

En concret, hem descobert que:

- 1.** L'expressió de miR-424(322)/503 al teixit adipós està estretament relacionada amb la presència de cèl·lules mare progenitores, la mida (hipertròfia) dels adipòcits i l'obesitat.
- 2.** El desenvolupament de les cèl·lules adiposes (adipòcits) a partir de cèl·lules precursors (adipogènesi) requereix el bloqueig transcripcional del clúster miR-424(322)/503, sobretot mitjançant la metilació del seu ADN.
- 3.** El clúster miR-424(322)/503 inhibeix l'adipogènesi mitjançant el control de programes genètics rellevants per a l'anabolisme dels àcids grassos i la diferenciació dels adipòcits. Entre d'altres, destaca el seu impacte sobre el gen de la γ -sinucleïna (SNCG), també conegut com a *gen específic del càncer de mama 1* (BCSG1).
- 4.** Les expressions antagoniques de miR-424(322) i SNCG/BCSG1 al greix humà convergeixen amb l'obesitat i poden ser revertides mitjançant una pèrdua significativa de pes, induïda quirúrgicament per derivació gàstrica (reducció d'estómac).
- 5.** L'SNCG és secretada pels adipòcits, on la seva activitat autoparacrina queda demostrada, incloent-hi l'exacerbació d'un estímul que convida a l'emmagatzematge de més triglicèrids i condiona el comportament d'uns adipòcits hipertròfics.

6. Les concentracions d'SNCG són més altes a la sang perifèrica dels ratolins modificats genèticament per no sintetitzar el clúster miR-424(322)/503 i al plasma de persones amb obesitat. És important destacar que, en paral·lel a l'augment de l'expressió de miR-424(322) i el declivi de les seves dianes específiques als dipòsits de greix, els nivells plasmàtics d'SNCG es normalitzen mitjançant la pèrdua de pes.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

És conegut que, en mamífers, l'expansió dels dipòsits de greix corporal deriva de l'augment en el nombre (hiperplàsia) i, sobretot, la mida (hipertròfia) de les cèl·lules adiposes (adipòcits). La desregulació dels sistemes que controlen aquests fenòmens pot condicionar el desenvolupament d'obesitat i els trastorns comunament associats amb aquesta, especialment problemes cardiometabòlics i risc de càncer. Tanmateix, l'habilitat de modular la creació de nous adipòcits (adipogènesi) i el seu creixement hipertròfic encara és prou desconeguda, ja que depèn de nombrosos factors i està estretament lligada a diversos *inputs* hormonals i dietètics. Per exemple, l'expansió del teixit adipós en ratolins mascles no presenta hiperplàsia (només hipertròfia) en resposta a una dieta rica en greixos, i els estudis sobre la dinàmica del teixit adipós humà després de la cirurgia bariàtrica (reducció d'estómac) indiquen que la pèrdua massiva de pes està en aquest cas condicionada principalment per una reducció significativa en la mida dels adipòcits i és la principal responsable dels efectes positius sobre l'homeòstasi energètica. Ningú no sap ben bé com es regulen aquests fenòmens.

Nombrosos estudis han mesurat abans als dipòsits de greix l'expressió de miRNA relacionats amb el desenvolupament de nous adipòcits. Són molècules capaces d'estimular-ne o inhibir-ne el creixement, destinades a orquestrar funcions metabòliques i endocrines de gran importància, gràcies al control que exerceixen sobre l'expressió dels gens (regulació posttranscripcional). No obstant això, se sap més aviat poc sobre el seu rol en el control de la mida i l'activitat de les cèl·lules adiposes, i el paper que tenen en la fisiologia de l'adipòcit i la fisiopatologia del teixit adipós en el pacient obès. A més, si bé la modulació dels miRNA representa un aproximació terapèutica molt engrescadora en el camp de l'obesitat i els trastorns associats, la naturalesa promíscua d'aquests factors genera molts dubtes sobre la translacionalitat dels resultats experimentals que es publiquen i la versemblança d'una eventual eina

terapèutica basada en el control genètic exercit per algunes d'aquestes molècules, que roman esquiva en gran manera. Només la dissecció sistèmica i sistemàtica d'aquestes connexions i el seu mecanisme d'acció, tant a escala molecular com d'organisme, aportarà el grau de coneixement i la comprensió necessaris per a una valoració completa d'aquests sistemes de regulació en un context clínic, amb una perspectiva eminentment terapèutica.

El clúster miR-424(322)/503 regula processos fonamentals que poden incloure la proliferació i plasticitat cel·lular, la resposta a l'estrès i l'activitat metabòlica, i controla la remodelació d'alguns teixits. En publicacions prèvies, els investigadors principals d'aquest projecte coordinat han descrit el paper del clúster miR-424(322)/503 en els processos de diferenciació que afecten les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària durant la lactància (Llobet-Navàs *et al.*, *Genes Dev.* 2014; 28(7):765-82. PMID: 24636986) i els adipòcits humans (Ortega *et al.*, *PLoS One.* 2010; 5(2):e9022; PMID: 20126310). El present treball estudia en profunditat i per primera vegada el control epigenètic que exerceixen aquests miRNA candidats al teixit adipós i el programa genètic que regulen durant la diferenciació de les cèl·lules adiposes, relacionat principalment amb el control de l'homeòstasi energètica tant en humans com en ratolins. En aquest estudi presentem resultats pioners i un marc unitari que avala la funció biològica, desconeguda fins ara, de miR-503 i, especialment, miR-424(322), recolzada sobre la superposició de resultats funcionals en ratolins, l'avaluació exhaustiva de sistemes cel·lulars complementaris, i dades clíniques que revelen la validesa translacional de les nostres observacions experimentals. D'aquesta manera, posem de manifest un nou mecanisme de regulació de la diferenciació i el compromís de les cèl·lules adiposes que pot prevenir, i fins i tot revertir, l'augment de pes en persones obesas. Així doncs, la «recuperació» de miR-424(322) al teixit adipós del pacient obès podria representar una via terapèutica única, clínicament adscrita als estàndards d'atenció de l'obesitat i les malalties relacionades amb un teixit adipós hipertròfic i disfuncional, mitjançant, sobretot, la modulació efectiva de la γ -sinucleïna (SNCG), una molècula també prou desconeguda que, en adipòcits, afavoreix la síntesi de greix, un context proinflamatori i l'expansió inadequada del teixit adipós, de manera que contribueix al desenvolupament d'un fenotip obès i, eventualment, a un risc més alt de certs tipus de càncer en individus obesos, ja que l'SNCG, també coneguda com a *gen específic del càncer de mama 1* (BCSG1), està fortament relacionada amb malalties a les quals els individus obesos són en general més propensos, com ara els

càncers d'esòfag, colorectal, de pròstata i, en particular, de mama, i alguns trastorns neurodegeneratius també més prevalents en persones obeses, com la demència o l'Alzheimer.

4. Bibliografia científica generada

Gràcies al finançament de la **Fundació La Marató de TV3** i al treball coordinat dut a terme per aquests dos equips investigadors, s'ha preparat un article que actualment es troba en procés de revisió en una revista de referència en el camp de la recerca científica i clínica translacional com és l'americana ***Science of Translational Medicine*** (factor d'impacte: 16,3 [2019-2020]; 1r decil en l'àrea de medicina):

Rodríguez-Barrueco R,^{*†} Latorre J,[†] Devis-Jáuregui K,[†] Lluch A, Bonifaci N, Llobet FJ, Olivan M, Coll-Iglesias L, Gassner K, Davis ML, Moreno-Navarrete JM, Castells-Nobau A, Arnoriaga-Rodríguez M, Ricart W, Fernández-Real JM, Silva JM,^{*} Ortega FJ,^{*‡} Llobet-Navas D.^{*‡} (*Autors de correspondència; †Mateixa contribució; ‡Colideratge de l'estudi.)

A microRNA cluster controls fat cell differentiation and adipose tissue expansion by regulating SNCG.

Sci Transl Med. Factor d'impacte: 16,3 (2019-2020).

En revisió de parells.

Acknowledgments: The authors are indebted to the participants of the FATBANK platform, promoted by the CIBEROBN and the IDIBGI Biobank (Biobanc IDIBGI, B.0000872), and integrated in the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration and coordination. We thank the IMIM Microarray Analysis Service (Hospital del Mar Medical Research Institute; Barcelona, Spain) for technical assistance. This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects CP17/00063, CP19/00109, and PI18/00550 (cofounded by European Regional Development Fund (ERDF) "a way to build Europe", by the European Social Fund (ESF), "investing in your future"), and by the Marató de TV3 Foundation (Project #201623-30-31). We also want to thank the CERCA and PERIS programmes (Generalitat de Catalunya) for institutional support. RRB (RyC-2016-19671) is recipient of a Ramón y Cajal scheme. DLN (MS17/00063), and FJO

(MS19/00109) are recipients of a Miguel Servet scheme; Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Gobierno de España (ES).

Arran de la tasca investigadora, l'ús de reactius acumulats i l'aplicació del coneixement adquirit en el decurs d'aquesta línia de recerca, també s'han publicat articles de rellevància en revistes científiques indexades. En totes aquestes publicacions consta que el projecte ha estat parcialment finançat per la **Fundació La Marató de TV3**:

Santamaría-Martos F, Benítez ID, Latorre J, Lluch A, Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ricart W, Sánchez de la Torre M, Mora S,* Fernández-Real JM,* Ortega FJ.* (*Autors de correspondència.)

Comparative and functional analysis of plasma membrane-derived extracellular vesicles from obese vs. nonobese women.

Clin Nutr. 2020; 39(4):1067-1076. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.04.008. PMID: 31036413. Factor d'impacte: 6,4 (2019-2020).

Publicat.

Acknowledgments: Electron microscopy characterization has been carried out using TEM facilities of the "Scientific and Technological Centers" (Universitat de Barcelona, CCiT-UB), School of Medicine, Hospital Clínic de Barcelona. This study was supported by research funds from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2015-66312, to JMF-R), the Instituto de Salud Carlos III (CIBEROBN), and by grants from the Govern de la Generalitat (Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut, PERIS 2016) and the Fundació La Marató de TV3 (440/C/2016, to FJO), the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca (AGAUR, FIDGR 2015, to JL), and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Francisco J. Ortega was also supported by an award from the Daniel Bravo Andreu Private Foundation.

Latorre J, Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Buxó M, Rodríguez-Hermosa JI, Gironés J, Fort JM, Vilallonga R, Ricart W, Simó R, Fernández-Real JM, Ortega FJ.* (*Autor de correspondència.)

Decreased TLR3 in Hyperplastic Adipose Tissue, Blood and Inflamed Adipocytes is Related to Metabolic Inflammation.

Cell Physiol Biochem. 2018; 51(3):1051-1068. DOI: 10.1159/000495487. PMID: 30476912. Factor d'impacte: 5,5 (2017). Publicat.

Acknowledgments: This work was partially supported by the CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and by grants from the Govern de la Generalitat (Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut, PERIS 2016) and from the Fundació La Marató de TV3 (440/C/2016) (to FJO), and also a predoctoral fellowship (AGAUR FI-DGR 2015) from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca (to JL). The CIBEROBN is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). We want also acknowledge the patients, the FATBANK platform promoted by the CIBEROBN and the IDIBGI Biobank (Biobanc IDIBGI, B.0000872), integrated in the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration and coordination.