

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 751**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2014 PCT/US2014/057871**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2014 E 14847279 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3049429**

54 Título: **Composiciones y métodos utilizando andamios de lisofosfatidilcolina**

30 Prioridad:

26.09.2013 US 201361882693 P
31.03.2014 US 201461973136 P
13.05.2014 US 201461992822 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2021

73 Titular/es:

NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE
(100.0%)
21 Lower Kent Ridge Road
Singapore 119077, SG

72 Inventor/es:

SILVER, DAVID, LAWRENCE;
NGUYEN, NAM, LONG y
ZAHLER, ROBERT

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 806 751 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos utilizando andamios de lisofosfatidilcolina

5 CAMPO

[0001] La invención se refiere a métodos para la detección de uno o más compuestos o ácidos grasos para determinar su administración mediada por lisofosfatidilcolina (LPC). La invención también se refiere a métodos para utilizar mutaciones y polimorfismos en Mfsd2a humano como marcadores de déficits neurológicos.

10

ANTECEDENTES

[0002] El torrente sanguíneo contiene numerosas especies de lípidos circulantes sobre las lipoproteínas, albúmina y otras proteínas de unión a lípidos. La diversidad de lípidos en la sangre es compleja, y la mayoría de las especies pertenecen a las clases de fosfolípidos, ácidos grasos y esfingolípidos. Muchos miembros de estas clases tienen funciones estructurales, como fosfatidilcolinas y funciones de señalización, como esfingosina-1-fosfato. Una especie lipídica de la que se sabe relativamente poco sobre sus funciones en la sangre son las lisofosfatidilcolinas (LPC). Las LPC se componen estructuralmente de tres componentes lipídicos principales: un glicerol, fosfolcolina y un ácido graso esterificado en los hidroxilos sn-1 o sn-2 del glicerol. Dentro de las membranas celulares, la mayoría de las LPC se sintetizan a través de la hidrólisis del resto de ácido graso en la posición sn-2 de los lípidos de fosfatidilcolina a través de las enzimas fosfolipasa A₂. Las LPC recientemente generadas son precursoras para la resíntesis de fosfatidilcolinas a través de reacciones de acilación a través de enzimas lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) que constituyen el Lands Cycle de la remodelación de fosfolípidos. Se ha propuesto que Lands Cycle es importante para regular las propiedades de la membrana, como el mantenimiento de altos niveles de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos en la envoltura nuclear. Además, el Lands Cycle también puede servir para mantener los LPC, que son tóxicos para las células, en niveles extremadamente bajos dentro de las membranas celulares. Curiosamente, los niveles de LPC en sangre son bastante altos, alcanzando aproximadamente 100 µm en humanos y roedores (Croset, M., Brossard, N., Polette, A. y Lagarde, M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. The Biochemical Journal 345 Pt 1, 61-67 (2000); Quehenberger, O. et al. La lipidómica revela una notable diversidad de lípidos en plasma humano. Journal of lipid research 51, 3299-3305, doi:10.1194/jlr.M009449. (2010)). Una cantidad menor de los LPC sanguíneos totales se generan en lipoproteínas en la circulación por la acción de la lecitina colesterol aciltransferasa en lipoproteínas de alta densidad y a través de la lipoproteína asociada a la fosfolipasa A₂ en lipoproteínas de baja densidad. La mayoría de las LPC en sangre humana y de roedores se sintetizan a través de la acción de la fosfolipasa A₂ en el hígado, donde se secretan en la albúmina. Las LPC de sangre más abundantes en humanos y roedores son palmitato, estearato y oleato de LPC. Las otras clases de liso-lípidos no localizados en la membrana, como el liso-PE, el liso-PI y el liso-PS se encuentran en niveles extremadamente bajos en la sangre y circulan principalmente en las lipoproteínas. La función fisiológica de las LPC en sangre se ha mantenido enigmática, pero algunos informes sugieren un papel de señalización en gran medida en la inflamación, la angiogénesis, la proliferación celular y la migración. Aquí se proporcionan nuevos usos para las LPC en diversas áreas, incluida la nutrición.

40

[0003] Con respecto a la nutrición, la mayoría de recién nacidos prematuros de bajo peso al nacer y de extremadamente bajo peso al nacer permanecen en la unidad de cuidados intensivos neonatales (NICU) por un período equivalente al tercer trimestre. Durante este tiempo, los recién nacidos prematuros que no pueden obtener una nutrición adecuada a través del tracto gastrointestinal requieren apoyo nutricional parenteral (NP). Se ha demostrado que la mala nutrición en los recién nacidos prematuros tiene resultados negativos importantes más adelante en la vida sobre el desarrollo físico e intelectual, y un mayor riesgo de trastornos cardiovasculares y metabólicos (Isaacs EB, et al. (2008) The effect of early human diet on caudate volumes and IQ. Pediatric research 63(3):308-314; Lapillonne A & Griffin IJ (2013) Feeding preterm infants today for later metabolic and cardiovascular outcomes. The Journal of pediatrics 162(3 Suppl):S7-16.).

50

[0004] Aunque las directrices internacionales sobre NP pediátrica se han refinado recientemente y se han convertido en el estándar de atención en todo el mundo (Nutritional needs of the preterm infant: scientific basis and practical guidelines. Cincinnati: Digital Educational Publishing Inc., OH.; Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, & Shamir R (2005) 1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 41 Suppl 2:S1-87), se está aceptando ampliamente que la ingesta nutricional en los recién nacidos prematuros que usan NP en UCIN es inadecuada (Martin CR, et al. (2009) Nutritional practices and growth velocity in the first month of life in extremely premature infants. Pediatrics 124(2):649-657; Olsen IE, Richardson DK, Schmid CH, Ausman LM, & Dwyer JT (2002) Intersite differences in weight growth velocity of extremely premature infants. Pediatrics 110(6):1125-1132). Es importante destacar que la composición óptima de nutrientes en la NP sigue siendo desconocida (Beardsall K, et al. (2008) Early insulin therapy in very-low-birth-weight infants. The New England journal of medicine 359(18):1873-1884; Clark RH, Chace DH, & Spitzer AR (2007) Effects of two different doses of amino acid supplementation on growth and blood amino acid levels in premature neonates admitted to the neonatal intensive care unit: a randomized, controlled trial. Pediatrics 120(6):1286-1296). El estándar de cuidado es una formulación de

65

aminoácidos, glucosa y lípidos. Los lípidos se derivan típicamente del aceite de soja (hasta 20%) y, en algunas formulaciones más nuevas, contienen aceites omega-3 (por ejemplo, SUMFLipid, de F). El aceite de soja proporciona ácidos grasos para obtener energía y los precursores de ácidos grasos omega-3 y omega-6 se sintetizan en ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA), que son esenciales para el desarrollo del cerebro. La conversión de ácidos grasos precursores en DHA y ARA depende del hígado del recién nacido, que a menudo tiene una función deficiente y no puede proporcionar cantidades adecuadas de estos ácidos grasos esenciales. Aquí se proporcionan soluciones a estos y otros problemas nutricionales.

[0005] Por otra parte, el papel de las mutaciones en la proteína Mfsd2a como la base de las enfermedades neurológicas y déficit ha sido también dilucidado. Aquí también se describen soluciones a estos desafíos médicos.

[0006] Reiling et al. (2011) PNAS 108 (29), 11756-65 discuten cómo un cribado genético haploide identificó el dominio facilitador principal que contiene el transportador 2A (MFSD2A) como un mediador clave en la respuesta a tunicamicina, y Bassik y Kampmann (2011) PNAS 08 (29): 11731-2 realizan comentarios sobre este descubrimiento. Berger y col. (2012) PLoS ONE 7 (11): e50629 comentan que MFSD2A tiene papeles en el crecimiento corporal, la función motora y el metabolismo de los lípidos. Leon y col. (2004) J. Agricultural and food chemistry 52 (5) 1207-1211 discuten el aislamiento e identificación de especies moleculares de fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina de la harina de semillas de jobo (*Simmondsia chinensis*).

[0007] El documento US2009/131368 describe mezclas y métodos de uso para fosfolípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados y especies de fosfolípidos de alquil éter. El documento WO1997028270 describe métodos para preparar lisofosfatidilcolina. Lema y Enhorning (1997) Biochim Biophys Acta. 1345 (1): 86-92 comentan las propiedades de la superficie después de una hidrólisis PLA2 simulada del componente principal del surfactante pulmonar, DPPC. El documento WO2002/032396 describe partículas de lípido-proteína-azúcar para el suministro de ácidos nucleicos.

[0008] Corr y col. (1979) Circ Res. 44(6):822-32 comentan los posibles trastornos electrofisiológicos arritmogénicos en las fibras de Purkinje caninas inducidas por lisofosfoglicéridos. Cho y Proulx (1971) Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes 225 (2) 214-223 describen estudios sobre el mecanismo de hemólisis por acil carnitinas, lisolecitinas y acilcolinas. Thiés y col. (1992) J. Neurochem. Sep; 59 (3): 1110-6 describen cómo los ácidos grasos insaturados esterificados en 2-acilo-1-lisofosfatidilcolina unidos a la albúmina son absorbidos más eficientemente por el cerebro de rata joven que la forma no esterificada. Lagarde y col. (2001) J Mol Neurosci. 16 (2-3): 201-4 comentan que la lisofosfatidilcolina es una forma portadora preferida de ácido docosahexaenoico para el cerebro. Bernoud y col. (1999) J Neurochem. 72 (1): 338-45 describen la transferencia preferencial de 2-docosahexaenoilo-1-lisofosfatidilcolina a través de una barrera hematoencefálica in vitro sobre el ácido docosahexaenoico no esterificado.

[0009] Koji Ohira y col. (2013) Molecular Brain 6, (1), 12 comentan la participación de mutaciones de la proteína asociadas a Synaptosomal en trastornos neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, trastorno por déficit de atención/hiperactividad y epilepsia. McNamara (2013) Prostaglandins Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 88 (1): 33-42 describe el papel del ácido docosahexaenoico en la maduración y patología del cerebro.

[0010] Nguyen et al (2014) Nature 509 (7501): 503-6 comentan que Mfsd2a es un transportador del ácido docosahexaenoico de ácidos grasos omega-3 esenciales y Ben-Zvi et al (2014) Nature 509 (7501): 507-511 describe cómo MSFD2A es crítico para la formación y función de la barrera hematoencefálica.

SUMARIO

[0011] La invención proporciona métodos para la utilización de andamios de lisofosfatidilcolina (LPC) para determinar el transporte de compuestos o ácidos grasos a través de la proteína Mfsd2a. Las composiciones y los métodos se pueden usar para seleccionar uno o más compuestos o ácidos grasos para determinar su suministro mediado por LPC. La invención también proporciona métodos para utilizar mutaciones en Mfsd2a humano como marcadores de déficit neurológicos.

[0012] En un primer aspecto de la invención, se proporciona aquí un método para cribar uno o más compuestos para determinar el transporte a través de la proteína Mfsd2a, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una mezcla biológica a ensayar con un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma una alteración homocigótica del gen Mfsd2a (ratón KO) y un ratón de tipo salvaje; (b) medir la cantidad de uno o más compuestos en un tejido o fluido del ratón KO y el ratón de tipo salvaje; y (c) comparar la cantidad de dicho uno o más compuestos en el tejido o fluido del ratón KO y el ratón de tipo salvaje, en donde cantidades mayores de dicho uno o más compuestos en el ratón de tipo salvaje en comparación con el ratón KO es una indicación de transporte del compuesto a través de la proteína Mfsd2a, en donde el tejido o fluido es cerebro u ojo.

[0013] En algunas realizaciones, el ratón KO no expresa proteína Mfsd2a funcional. En algunas realizaciones, la mezcla biológica se deriva de leche, extractos de aceite de pescado o formulaciones de LPC. En algunas realizaciones, el tejido o fluido es cerebro, hígado, corazón o leche materna. En algunas realizaciones, el método de contacto es por administración oral o i.v.

[0014] En un segundo aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para seleccionar uno o más compuestos para determinar el transporte a través de la proteína Mfsd2a, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una mezcla biológica a ensayar con una línea celular que comprende un Mfsd2a ADNc humano de tipo salvaje o un Mfsd2a ADNc humano mutante o una célula transfectada simulada; (b) medir la cantidad de dicho uno o más compuestos en células que comprenden el ADNc Mfsd2a humano de tipo salvaje y una célula que comprende ADNc Mfsd2a humano mutante o una célula transfectada simulada; y (c) comparar la cantidad de dicho uno o más compuestos en las células que comprenden el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje y las células que comprenden Mfsd2a ADNc humano mutante o células transfectadas simuladas, en las que cantidades mayores de dicho uno o más compuestos en las células que comprenden ADNc Mfsd2a de tipo salvaje en comparación con las células que comprenden Mfsd2a ADNc humano mutante o células transfectadas simuladas es una indicación de transporte del compuesto a través de la proteína Mfsd2a.

[0015] En algunas realizaciones, la célula es HEK 293. En algunas realizaciones, el Mfsd2a ADNc humano mutante comprende una mutación en una posición correspondiente a D93 o D97 en la secuencia de la proteína de Mfsd2a humano.

[0016] En un tercer aspecto, la invención proporciona un método de cribado para compuestos que modulan el transporte a través de la proteína Mfsd2a que comprende: (a) poner en contacto las líneas celulares que comprenden un Mfsd2a ADNc humano de tipo salvaje o un Mfsd2a ADNc humano mutante o una célula transfectada de manera simulada con palmitato de LPC, oleato, estearato, linoleato, linolinato, araquidonato, docosahexaenoato o un derivado; (b) medir la absorción del palmitato, el oleato, el estearato, el linoleato, el linolenato, el araquidonato, el docosahexaenoato de LPC o un derivado en presencia y ausencia de un compuesto de prueba en las células que comprenden el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje humano y las células que comprenden Mfsd2a ADNc humano mutante o células transfectadas simuladas; en donde un aumento o disminución del nivel de absorción de palmitato de LPC, oleato, estearato, linoleato, linolinato, araquidonato, docosahexaenoato o un derivado en las células que comprenden el ADNc Mfsd2a humano de tipo salvaje en presencia del compuesto de prueba como en comparación con la ausencia de las identidades del compuesto de prueba, el compuesto como un modulador del transporte a través de la proteína Mfsd2a.

[0017] En algunas realizaciones, la célula es HEK 293. En algunas realizaciones, el Mfsd2a ADNc humano mutante comprende una mutación en una posición correspondiente a D93 o D97 en la secuencia de la proteína de Mfsd2a humano. En algunas realizaciones, el compuesto de prueba se transporta directamente a través de la proteína Mfsd2a.

[0018] En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método de evaluación de aumento de la susceptibilidad para los déficits neurológicos en un sujeto que comprende: (a) proporcionar una muestra biológica del sujeto, en donde la muestra comprende todos, o una porción de, un gen de Mfsd2a; y (b) detectar la presencia de una mutación en el gen Mfsd2a o la porción del mismo en la muestra, en donde la mutación da como resultado una sustitución Thr159Met o Ser166Leu en la proteína Mfsd2a; y (c) evaluar que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a los déficits neurológicos en función de la presencia de la mutación en el gen Mfsd2a o la porción del mismo.

[0019] En algunas realizaciones, el déficit neurológico es un déficit en la memoria y el aprendizaje o la ansiedad.

[0020] En algunas realizaciones, el sujeto es una mujer antes de la concepción o durante el embarazo.

[0021] En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de una dieta alta en DHA o i.v. o tratamiento enteral con LPC, si la mutación o polimorfismo en el gen Mfsd2a o la parte del mismo está presente. En algunas realizaciones, el LPC comprende LPC-DHA.

[0022] En algunas realizaciones, el sujeto es un niño o un adulto con diagnóstico de problemas con la función cognitiva. En algunas realizaciones, la función cognitiva es una discapacidad de aprendizaje o ansiedad.

[0023] En algunas realizaciones, la detección comprende poner en contacto la muestra con una sonda de oligonucleótido que se hibrida preferentemente con el gen Mfsd2a o la porción del mismo. En algunas realizaciones, la detección comprende amplificar por PCR el gen Mfsd2a o la porción del mismo. En algunas realizaciones, la detección comprende secuenciar el gen Mfsd2a, la porción del mismo, o el Mfsd2a ADNc correspondiente o una porción del mismo.

[0024] En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para evaluar la función de transporte de una proteína Mfsd2a de un sujeto que comprende: (a) expresar una prueba Mfsd2a ADNc en una primera célula y un Mfsd2a ADNc de tipo salvaje en una segunda célula; (b) poner en contacto la primera célula que expresa el Mfsd2a ADNc de prueba y la segunda célula que expresa el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje con ácidos grasos LPC-DHA o LPC-omega 3; y (c) medir la absorción de ácidos grasos LPC-DHA o LPC-omega 3 en la primera célula que expresa el Mfsd2a ADNc de prueba y la segunda célula que expresa el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje, en donde un nivel disminuido de absorción de ácidos grasos LPC-DHA o LPC-omega 3 en la primera célula que expresa el Mfsd2a ADNc de prueba en comparación con la segunda célula que expresa el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje indica que el Mfsd2a ADNc de prueba

codifica una proteína deficiente para el transporte.

[0025] En algunas realizaciones, la prueba Mfsd2a ADNc codifica una mutación Thr159Met o Ser166Leu. En algunas realizaciones, la prueba Mfsd2a ADNc codifica uno o más de los polimorfismos enumerados en la Tabla 4, 6, o 7.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026]

Fig. 1. La localización de Mfsd2a en la barrera sangre-cerebro y los déficits neuronales en ratones KO. **a**, Mfsd2a (rojo) está altamente enriquecido en micro vasos del cerebro, que se muestra aquí en la región CA1 con tinción de NeuN (verde) de neuronas maduras. **b, c**, Mfsd2a se expresa en células endoteliales de la barrera hematoencefálica en contacto cercano con los pies de los astrocitos como se muestra por la tinción con GFAP. **d**, Pérdida de células de Purkinje detectadas por tinción de parvalbúmina (Pvalb) en cerebelo de ratones KO. **e**, cuantificación de células de Purkinje en el cerebelo de ratones WT y KO. ***P<0,001. **f**, la tinción de NeuN en el hipocampo de secciones cerebrales sagitales de ratones WT y KO de 8 semanas de edad indica neuronas maduras disminuidas en regiones específicas del hipocampo de ratones KO. **g**, cuantificación de números de neuronas en CA1, CA3 y regiones de giro dentado (DG) de ratones examinados en **(f)** arriba. ***P<0,001. Los datos se expresan como promedio \pm SEM.

Fig. 2. Los cerebros de ratones Mfsd2a KO son deficientes en DHA. Análisis lipidómico completo de fosfolípidos cerebrales, hepáticos y cardíacos de ratones adultos con MFSD2a knockout (KO) y de tipo salvaje (WT). **a**, representación del mapa de calor del porcentaje de especies de fosfolípidos individuales medidas desde el cerebro, el hígado y el corazón. Las especies que contienen DHA y AA están resaltadas en rojo y azul, respectivamente. LysoPC: lisofosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina, lisoPE: lisofosfatidil etanolamina, PE: fosfatidil etanolamina, lisoPI: lisofosfatidil inositol, PI: fosfatidil inositol, PS: fosfatidil serina, p: plasma. **b, d, f**, niveles totales de DHA en fosfolípidos cerebrales, hepáticos y cardíacos (WT, N=5; KO, N=4). **c, e, f**, niveles totales de AA en cerebro, hígado y corazón. ***P<0,0001, ** P<0,01, * P<0,05. Los niveles de DHA y AA se expresan como promedio \pm SEM del porcentaje del nivel total de fosfolípidos. Consulte la Tabla 2.

Fig. 3. Ensayos de transporte basados en células de LPC radiomarcadas. **a, b, c**, transporte dependiente de la concentración de LPC-[¹⁴C]DHA, LPC-[¹⁴C]oleato, LPC-[³H]palmitato después de 30 minutos. Ratón Mfsd2a (WT) y construcciones mutantes D92A, D96A se probaron para la absorción de LPC radiomarcadas a las concentraciones indicadas. **d**, preferencia de transporte de comparación de LPC-[¹⁴C]DHA, LPC-[¹⁴C]oleato, LPC-[³H]palmitato. **e**, incorporación biológica de LPC-[¹⁴C]DHA radiomarcado. **f**, cuantificación de bandas de PC a partir de placas de TLC mostradas en **e**. **g**, bio-incorporación de LPC-[¹⁴C]oleato en fosfatidilcolina. **h, f**, cuantificación de bandas de PC a partir de placas de TLC mostradas en **g**. **i**, la actividad de transporte del ratón Mfsd2a depende del sodio (Ch⁺ indica colina). **k**, curva dosis-respuesta para la concentración de sodio dependiente del transporte de 50 μ m de LPC-[¹⁴C]oleato por Mfsd2a. Para **a-d, f, h, i, k** los datos por triplicado se expresan como promedio \pm SEM. ***P<0,0001. **Fig. 4. La absorción de LPC radiomarcadas por el cerebro disminuyó en ratones KO.** **a**, ratones macho de 6-7 semanas de edad fueron inyectados i.v. con la misma dosis de LPC-[¹⁴C]DHA y **b**, LPC-[¹⁴C] oleato. El cerebro, el hígado y el corazón se recolectaron 2 horas después de la inyección para la extracción de lípidos y se cuantificó DPM usando recuento de centelleo. La absorción se expresa como promedio \pm SEM. (WT, N=5; KO, N=5). ***P<0,0001, *P<0,05. **c**, estructura de fluorescencia NBD-LPC. **d**, las células HEK293 que expresan Mfsd2a de tipo salvaje mostraron una actividad de absorción significativamente mejorada para NBD-LPC en comparación con el mutante simulado (plásmido vacío), D92A y D96A. **e**, el análisis de TLC mostró que NBD-LPC fue bioincorporado en la PC. El transporte de NBD-LPC fue suprimido por un exceso molar de 10 veces de LPC-18: 0 (frío). El mutante D92A, D96A tenía una actividad de transporte similar para NBD-LPC que las células transfectadas simuladas. **f**, cuantificación de la banda de PC a partir de placas de TLC mostradas en **e**. **g**, la captación cerebral de NBD-LPC disminuyó en ratones KO. Se inyectaron i.v. ratones machos (WT, N=3; KO, N=3) de 6 semanas de edad con 300 μ g de complejo NBD-LPC/BSA. **h**, la fluorescencia de quince secciones del cerebro de ratones WT y KO se cuantificó y expresó como intensidad de fluorescencia por píxel. Los datos se expresan como promedio \pm SEM. **P<0,001. **Fig. 5. Mfsd2a está altamente expresado en el endotelio de micro vasos en el cerebro.** **a**, la expresión de Mfsd2a en el endotelio se localiza conjuntamente con el transportador de glucosa Slc2a1 (Glut1). La punta de flecha muestra células endoteliales en los vasos sanguíneos del cerebro. Barras de escala: 5 μ m. **b**, Mfsd2a está altamente expresado en micro vasos en el cerebro, aquí se muestran secciones en regiones de giro dentadas. Barras de escala: 50 μ m. **c**, Mfsd2a y el marcador de pericito Pdgrf-b se localizan en la microvasculatura cerebral, pero como se muestra en el panel **d** Mfsd2a no se expresa en pericitos. La punta de flecha amarilla y roja en el panel **d** indica células endoteliales y pericitos, respectivamente. (Barras de escala en **c**: 20 μ m; en **d**: 5 μ m).

Fig. 6. Se encuentra un patrón de expresión similar de Mfsd2a en el endotelio de micro vasos en el cerebro del mono. **a**, Mfsd2a se expresa altamente en micro vasos y se localiza junto con el transportador de glucosa Slc2a1 (Glut1) en el cerebro, aquí se muestran secciones en el cerebelo del mono P4. Barras de escala: 200 μ m. **b, c**, Expresión de Mfsd2a en el endotelio de los micro vasos del cerebro. Se muestra la región del hipocampo. GFAP es un marcador de astrocitos.

Fig. 7. Localización de Mfsd2a en el BBB del análisis de fetos y lípidos e15.5. **a**, Mfsd2a (rojo) se expresa altamente en micro vasos y se localiza con el transportador de glucosa Slc2a1 (Glut1, verde) en el cerebro

fetal. Barras de escala: 100 μ m. **b**, la medición por espectrometría de masas de fosfolípidos en el cerebro fetal e18,5 de WT (n=6) y KO (n=5) mostró que los cerebros fetales KO habían reducido significativamente los niveles de DHA, mientras que los niveles de AA aumentaron. ***P<0,001. Ver archivo fuente para el conjunto de datos completo.

5 **Fig. 8.** muestra **a**, peso placentario y fetal. Se recogieron y pesaron placentas y fetos de dos ratones preñados HET (E18,5) cruzados con un KO macho. No hubo diferencias significativas en el peso placentario y fetal entre HET (n=7) y KO (n=11). **b**, se usó la suspensión de la cola para evaluar la presencia del fenotipo de unión de la pata de ratones WT y KO de 10 semanas de edad.

10 **Fig. 9.** muestra **a**, imagen representativa de cerebros de dos pares de camada WT y KO de 8 semanas de edad. **b**, el peso cerebral de los ratones KO (n=4) es significativamente menor que el de los compañeros de camada WT (n=4). ***P<0,001. Los datos se expresaron como promedio \pm SEM. **c**, Morfología macroscópica de cerebros y secciones sagitales de cerebros. Secciones sagitales de cerebro de ratones WT y KO de 8 semanas de edad se tiñeron con NeuN para visualizar células neuronales y anticuerpo policlonal Mfsd2a para visualizar la expresión de Mfsd2a. Se muestra que Mfsd2a se expresa ampliamente en el cerebro. Barras de escala: 1 mm. **d**, tinción H&E de la región del hipocampo de ratones WT y KO de 8 semanas de edad que indica un hipocampo más pequeño en ratones KO. Barras de escala: 500 μ m.

15 **Fig. 10. Los ratones Mfsd2a KO exhiben déficits en el aprendizaje, la memoria y la ansiedad severa.** **a**, **b**, la prueba del laberinto Y y la prueba de reconocimiento de objetos novedosos **c**, **d** se utilizaron para evaluar el aprendizaje espacial, la memoria a corto plazo (STM) y la memoria a largo plazo (LTM) de los ratones WT y KO, respectivamente. Los ratones KO exhibieron entradas de brazo total significativamente disminuidas en una prueba de laberinto Y para memoria de trabajo espacial. Los ratones KO mostraron preferencias significativamente reducidas para objetos nuevos en las pruebas de reconocimiento de objetos nuevos, indicativos de defectos en la memoria a corto y largo plazo, respectivamente. "Entrenar" indica el período de entrenamiento. **e-h**, prueba de laberinto cero, **i-m**, pruebas de caja de luz/oscuridad se utilizaron para evaluar la ansiedad de los ratones WT y KO, respectivamente. Los ratones KO mostraron transiciones disminuidas y caídas de cabeza en brazos abiertos durante la prueba de laberinto cero para comportamientos de ansiedad. Los ratones KO mostraron una entrada disminuida en la caja de luz y una latencia aumentada para ingresar en la caja de luz 7 durante la prueba de ansiedad en la caja de luz/oscuridad. **m-o**, prueba de campo abierto para actividad. Los ratones KO mostraron una distancia de viaje reducida en la prueba de campo abierto para la actividad locomotora. Durante la prueba de campo abierto, los ratones KO no tuvieron actividad vertical indicativa de disfunción motora, y disminuyeron el tiempo pasado en el centro, indicativo de una exploración reducida en comparación con los ratones WT. El mayor tiempo pasado en las esquinas del campo abierto sugiere que los ratones KO estaban más ansiosos que los ratones WT, y son congruentes con nuestros resultados de las pruebas de laberinto cero y caja de luz/oscuridad. Ratones WT (n=11-13) y ratones KO (n=8-10). ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05. Los datos se expresaron como promedio \pm SEM.

20 **Fig. 11a-e. Especies de fosfolípidos individuales analizadas por espectrometría de masas.** Análisis lipídico exhaustivo de fosfolípidos cerebrales, hepáticos y cardíacos de nocaout Mfsd2a (KO, N=4, barras sombreadas) y compañeros de camada de tipo salvaje (WT, N=5, barras en blanco). LysoPC: lisofosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina, lisoPE: lisofosfatidil etanolamina, PE: fosfatidil etanolamina, lisoPI: lisofosfatidil inositol, PI: fosfatidil inositol, PS: fosfatidil serina, p: plasma. Los niveles de ácido graso se calcularon como porcentaje del total de fosfolípidos en los órganos correspondientes y se expresaron como promedio \pm SEM. Los gráficos superpuestos se usaron para presentar las diferencias de las mismas especies de ácidos grasos de WT con ratones KO.

25 **Fig. 12. Mfsd2a no transporta ácidos grasos no esterificados.** **a**, Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de fosfolípidos y lípidos neutros de células HEK293 transfectadas con Mfsd2a de ratón y Mfsd2a humano después de la incubación durante la noche con 100 μ m [¹⁴C]-DHA. Estándar: libre [¹⁴C]-DHA. **b**, El análisis por TLC de los fosfolípidos y lípidos neutros de células HEK293 transfectadas con el ratón Mfsd2a y mutantes después de la incubación durante la noche con 100 μ m [¹⁴C]-oleato. El protocolo de TLC utilizado se describió en Métodos. PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, TAG: triglicérido, CE: colesterol éster.

30 **Fig. 13. Expresión y localización de ratones Mfsd2a y mutantes en células HEK293 24 horas después de la transfección.** **a**, localización de Mfsd2a, D92A y D96A en la membrana plasmática (rojo). **b**, análisis de transferencia Western de expresión de Mfsd2a, D92A y D96A en células HEK293 después de la transfección de 24 horas.

35 **Fig. 14. Actividad de transporte LPC de Mfsd2a humano.** **a**, incorporación biológica de LPC-[¹⁴C]DHA radiomarcado y **c**, LPC-[¹⁴C]oleato en fosfatidilcolina (PC). Las células que expresan Mfsd2a humano se incubaron con LPC-[¹⁴C]DHA o 50 μ m de LPC-[¹⁴C]oleato. Los lípidos se extrajeron de las células después de 30 minutos de incubación con LPC-[¹⁴C]DHA y 120 minutos de incubación de oleato LPC-[¹⁴C] y se analizaron usando el método TLC para resolver fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilcolina (LPC). **b**, Transporte dependiente de la dosis de LPC-[¹⁴C]DHA y **d**, LPC-[³H]oleato por Mfsd2a humano (hMfsd2a) y plásmido vacío (simulado) que expresa HEK293.

40 **Fig. 15. Transporte en masa y dependiente del tiempo de LPC.** **a**, Dependencia temporal del transporte de 50 μ m LPC-[¹⁴C] oleato. **b**, aumento de la captación neta de ligando LPC en células que expresan Mfsd2a. Análisis de cromatografía de capa fina (CCF) de los fosfolípidos de las células HEK293 transfectadas con el ratón Mfsd2a y mutantes después de 1 hora después de la incubación con 100 μ m no marcado LPC-oleato. Los números que se muestran son cambios de los niveles de PC en relación con el simulacro. PC estándar: fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina.

Fig. 16. La actividad de transporte de Mfsd2a no es dependiente de protones y litio. **a**, la actividad de transporte de Mfsd2a (WT) de ratón, D92A, D96A y células de expresión simulada no fue significativamente diferente a los pH indicados. **b**, la actividad de Mfsd2a es dependiente de sodio pero no de litio. Los datos se expresaron como cambio de pliegue de células que expresan Mfsd2a a células simuladas correspondientes tratadas con las mismas condiciones. **c**, la actividad de transporte de Mfsd2a no depende de BSA ya que el palmitato de LPC solubilizado en etanol o en forma micelular fue transportado por Mfsd2a, aunque a un nivel inferior que con BSA.

Fig. 17. Ensayo de competición para determinar las estructuras de ligando de Mfsd2a. Todos los ensayos de competición se realizaron utilizando 25 μm de LPC- ^{3}H palmitato como ligando con o sin exceso molar de 10 veces (250 μm) de los competidores indicados. **a**, Las estructuras de los competidores de lípidos utilizados en **b** y **c**. **b**, ensayos de competencia con LPC de cadena de acilo indicados. **c**, ensayo de competencia con grupos de cabeza indicados. Los ensayos se detuvieron después de 30 minutos de incubación. La actividad competitiva se expresó como porcentaje de control (actividad de Mfsd2a sin competidor). LPC: lisofosfatidilcolina, LPE: lisofosfatidiletanolamina, LPS: lisofosfatidilserina, LPA: ácido lisofosfatídico, 6:0:hexanoato, 8:0:docanoato, 10:0:octanoato, 12:0:laurato, 14:16:0:miristato: palmitato, 18:0:estearato, 18:1:oleato. GPC:alfaglicerilfosfolina. **d**, estructuras representativas de los competidores de lípidos bioactivos utilizados en **e** y **f**. **e**, ensayo de competición con formas lisofosfolípidas de plasmógenos y factor de activación plaquetaria (FAP). Este experimento se realizó junto con **b**, de modo que el control y el simulacro que se muestran en **b** pueden usarse como referencia. **f**, PAF y lisosfingomielina (lysoSM) también mostraron una fuerte competencia, mientras que la esfingosina 1-fosfato (S1P) no compitió por la captación de LPC- ^{3}H 16:0. La actividad competitiva se expresó como porcentaje de control (actividad de Mfsd2a sin competidor). **g**, estructura representativa de análogos lisofosfolípidos no biológicos foscolina-16 (Miltefosina) que tienen una cadena de alquilo de 16 carbonos. **h**, ensayos de competición de foscolinas indicadas con palmitato de LPC- ^{3}H . Los ensayos se detuvieron después de 15 minutos de incubación. La actividad competitiva se expresó como porcentaje de control (actividad de Mfsd2a sin competidor). La foscolina con una longitud de cadena alquílica de 8 (Fos-8), 10 (Fos-10) y 12 (Fos-12) carbonos no compitieron, mientras que la foscolina con una longitud de cadena alquílica de 16 carbonos (Miltefosina) mostró una fuerte competencia con LPC- ^{3}H 16:0. Los datos se expresan como promedio \pm SEM; ***P<0,001.

Fig. 18. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de fosfolípidos de células HEK293 transfectadas con ratón Mfsd2a y mutantes después de 30 minutos después de la incubación con TopFluor-LPE 25 μm **a**, análisis por TLC de fosfolípidos. **b**, cuantificación de la intensidad de la banda de PE de la placa TLC. PE: fosfatidiletanolamina, LPE: lisofosfatidiletanolamina.

Fig. 19. La captación cerebral de ^{14}C DHA no esterificado no se redujo en los ratones con deficiencia de Mfsd2a. Se inyectaron i.v. ratones machos de 7 semanas de edad con 1 mmol de complejo ^{14}C DHA/BSA. El cerebro, el hígado y el corazón se recolectaron 2 horas después de la inyección para la extracción de lípidos y se cuantificó DPM usando recuento de centelleo. **a-c**, la absorción de ^{14}C DHA no esterificado en el cerebro, corazón e hígado WT y KO se expresó como DPM/g. **d-f**, el nivel de absorción de DHA en "a-c" se convirtió en nmol/g. **g-i**, Una comparación entre la cantidad absoluta de absorción de DHA en forma de LPC-DHA (convertida de la figura 4 a nmol/g en 2 horas) y DHA no esterificado (tomado de d-f arriba) en el cerebro, corazón e hígado de ratones WT. Se inyectó la misma cantidad de LPC-DHA y DHA en ratones. La cantidad de captación de LPC-DHA fue mucho mayor que la captación de DHA no esterificado por el cerebro de tipo salvaje. Los datos se expresan como promedio \pm SEM. (WT, N=5; KO, N=5). ***P<0,0001, *P<0,05.

Fig. 20. La absorción cerebral de TopFluor-LPC no esterificado se redujo en los ratones con deficiencia de Mfsd2a. Este experimento se realizó como se describe para NBD-LPC en la figura 4. **a**, estructura de TopFluor-LPC. **b**, las células HEK293 que expresan Mfsd2a de tipo salvaje mostraron una actividad de absorción significativamente mejorada para TopFluor-LPC en comparación con el mutante simulado (plásmido vacío), D92A y D96A. **c**, el análisis de TLC mostró que TopFluor-LPC fue bioincorporado en la PC. **d**, cuantificación de la banda de PC a partir de placas de TLC mostradas en **c**. **e**, la absorción cerebral de TopFluor-LPC disminuyó en ratones KO. Se inyectaron i.v. ratones machos (WT, N=3; KO, N=3) de 7 semanas de edad con 300 μg de complejo TopFluor-LPC/BSA. **f**, se cuantificó la fluorescencia por pixel. Los datos se expresan como promedio \pm SEM. **P<0,001.

Fig. 21. La suplementación dietética con DHA no logró rescatar los fenotipos de desactivación de Mfsd2a. Ratones hembras heterocigóticas fueron alimentados con aceite 100ul DHA (que contiene 26% de triglicéridos DHA y 6% EPA, omega-3 total es 35%) cada 2 días durante 2 semanas antes de la concepción en cruces con machos KO. Los ratones heterocigotos no exhiben fenotipos detectables, tienen DHA cerebral similar a los ratones WT (no mostrados) y, por lo tanto, son similares a WT. La razón para usar los entrecruces HET y KO fue aumentar el rendimiento de los ratones KO en este estudio de rescate. Durante la gestación, las ratas preñadas continuaron con sonda de DHA cada 2 días. Las sondas de las madres continuaron durante la lactancia y las crías fueron destetadas a una dieta normal a las 3 semanas de edad y se alimentaron cada 2 días con DHA durante 8 semanas. **a**, peso cerebral de ratones adultos WT (n=4) y KO (n=4) de 8 semanas de edad después del tratamiento con aceite dietético DHA. Los cerebros de ratones KO todavía eran significativamente más pequeños. **b-e**, los ratones KO tratados con DHA no redujeron el fenotipo de ansiedad fuerte según se determinó usando la prueba de caja de luz/oscuridad. Para investigar por qué el DHA en la dieta no pudo rescatar los fenotipos KO, probamos la hipótesis de que la absorción de DHA derivado de la madre (en este caso, el DHA entregado a la madre a través de una sonda), podría no entrar

en el cerebro de los ratones KO durante el desarrollo del cerebro. Para probar esta posibilidad, las madres embarazadas se cruzaron con los padres KO en e17,5-e19,5, fueron calibradas con [¹⁴C]DHA y se cuantificó la absorción en los cerebros fetales. Los datos que se muestran en **f** indican que los cerebros de los ratones KO exhibieron una reducción del 80% en la absorción de [¹⁴C]DHA en relación con los ratones het dentro de las mismas madres (n=4 WT, N=6 KO). Por lo tanto, *Mfsd2a* expresado durante el desarrollo fetal es importante para el transporte de DHA al cerebro. Los datos se expresan como promedio ± SEM. *P<0,05, ***P<0,001.

Fig. 22. Los humanos con mutaciones homocigotas *Mfsd2a* exhiben microcefalia severa. Un pedigrí de una familia egipcia consanguínea para la mutación Thr159Met. Los objetos negros en el pedigrí indican niños afectados. La imagen a la derecha del pedigrí es de la niña afectada que se muestra como nº 2 en el pedigrí. **b**, imágenes estructurales del cerebro mediante resonancia magnética que muestran microcefalia e hidrocefalia severas en niños afectados. Tenga en cuenta la pequeña corteza y la falta de pliegues cerebrales. Estos datos son de Zaki MS et al. *Cerebro* 2012; 135: 2416-2427, en donde se pueden encontrar otros datos clínicos. **c**, Imagen de resonancia magnética cerebral de un niño no relacionado de una familia libia con una mutación homocigótica Ser166Leu. Tenga en cuenta la similitud en el fenotipo entre estos dos pacientes no relacionados.

Fig. 23. Las mutaciones *MFSD2A* causan microcefalia severa y ventriculomegalia. **(A)** Familias consanguíneas 1422 y 1825 designadas por número en cada generación. Círculos: hembras, cuadrados: machos, barras: fallecidas, asterisco: muestreadas. **(B)** Superior: resonancia magnética axial, inferior: resonancia magnética parasagital. Las imágenes muestran ventrículos laterales (asteriscos) enormemente agrandados, así como hipoplasia del cuerpo caloso y el tronco encefálico (puntas de flecha) y cerebelo (flechas) en todos los niños afectados. **(C)** Estructura exónica del gen *MFSD2A* con ubicación de las mutaciones del paciente **(D)** Alineación de secuencias de aminoácidos de humanos, ratones, peces y ortólogos bacterianos de *MFSD2A* que muestran la conservación de los residuos T159 y S166 (SEQ ID NOS 9-16, respectivamente, en orden de aparición). **(E)** Ubicación de las mutaciones relativas a la proteína predicha. TM: dominios de transmembrana, naranja: dominio de superfamilia facilitador principal, dominio transportador de sustrato general.

Fig. 24. Las mutaciones *MFSD2A* p.T159M y p.S166L muestran un transporte LPC deteriorado. **(A)** transferencia Western de proteínas *MFSD2A* (WT), p.T159M mutante y p.S166L expresadas en células HEK293. Las proteínas mutantes muestran modificación postraduccional y estabilidad indistinguibles de las de tipo salvaje. **(B)** Las proteínas mutantes muestran localización de membrana en células HEK293 transfectadas indistinguibles de las de tipo salvaje. **(C)** Vista de la cavidad interna del *MFSD2A* humano generado a partir de un modelo de subprocesos utilizando una estructura de resolución atómica de MelB como plantilla. El dominio transmembrana II contiene los residuos de unión a sodio conservados D93 y D97. El dominio transmembrana i.v. contiene los residuos T159 y S166. Transporte dependiente de la concentración de LPC-[¹⁴C]DHA **(D)** LPC-[¹⁴C]oleato **(E)** y LPC-[¹⁴C]palmitato **(F)** después de 30 min. Las construcciones mutantes p.T159M y p.S166L muestran un transporte defectuoso a través de un rango de concentraciones. **(G)** Los mutantes y simulacro demostraron una reducción de la incorporación biológica de LPC-[¹⁴C]oleato radiomarcado en fosfatidilcolina (PC) en comparación con WT. La mayor cantidad de LPC observada en las células que expresan simulacro, p.T159M y p.S166L refleja una absorción de LPC defectuosa. Cuantificación de bandas de PC **(H)** y LPC **(I)** radiomarcadas a partir de placas de TLC mostradas en **(G)**. Los experimentos se realizaron dos veces con triplicado. Los datos se expresan como promedio ± SEM. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05.

Fig. 25. LPC total en plasma y especies individuales de LPC por espectrometría de masas lipodímicas. Concentración de plasma total LPC **(A)** y especies comunes de longitud de cadena C16-22 LPC **(B)** de ratones WT (n=5) y *Mfsd2a* KO (n=5), con 3 réplicas técnicas. **(C)** Cuantificación de oleato de LPC [¹⁴C] inyectado a lo largo del tiempo en el plasma de ratones *Mfsd2a* KO (n=4) real a compañeros de camada WT (n=3). Concentraciones totales de LPC **(D)** en plasma y especies comunes de LPC **(E)** de controles, padres no afectados e individuos afectados de las familias 1422 y 1825. El análisis se realizó una vez con 3 réplicas técnicas de dos muestras de plasma independientes recolectadas en días diferentes. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Fig. 26. Mapa de homocigosidad de individuos afectados. Gráficos de homocigosidad que muestran bloques homocigotos (rojo) en individuos afectados de las familias 1422 y 1825, con mutaciones homocigotas de *MFSD2A*. Gris: bloque homocigoto que comprende superposiciones de *MFSD2A* en todos los afectados. Flecha: ubicación de *MFSD2A*.

Fig. 27. Cromatogramas de la secuencia de Sanger del padre (heterocigoto), un hermano afectado (homocigoto) y no afectado o control no relacionado (homocigoto normal de referencia) que muestra las mutaciones (flecha). Las secuencias de la familia 1422 descritas como SEQ ID NOS 17-19, respectivamente, en orden de aparición, y las secuencias de la familia 1825 descritas como SEQ ID NOS 20-22, respectivamente, en orden de aparición.

Fig. 28. *MFSD2A* se expresa en células endoteliales de microvasos en cerebro fetal humano. *MFSD2A* (rojo) se expresa altamente en el endotelio y se localiza junto con el transportador de glucosa GLUT1 (verde) en el cerebro fetal humano. Las flechas muestran células endoteliales en los vasos sanguíneos del cerebro. Barra de escala 20 µm.

Fig. 29. Expresión de *MFSD2A* en tejidos humanos. La RT-PCR en tejidos adultos humanos muestra expresión en todos los tejidos probados, excepto en el músculo esquelético y el corazón. *GAPDH* se utilizó

como control de carga.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Introducción

[0027] El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso omega-3 esencial para el crecimiento normal del cerebro y la función cognitiva (Kidd, PM Omega-3 DHA y EPA para la cognición, comportamiento y estado de ánimo: hallazgos clínicos y sinergias estructural-funcionales con los fosfolípidos de la membrana celular. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic* 12, 207-227 (2007); Horrocks, L. A. & Yeo, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 40, 211-225, doi:10.1006/phrs.1999.0495 (1999); Mozaffarian, D. & Wu, J. H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology* 58, 2047-2067, doi:10.1016/j.jacc.2011.06.063 (2011); Connor, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition* 71, 171S-175S (2000)). En línea con su importancia en el cerebro, el DHA está altamente enriquecido en fosfolípidos cerebrales (Breckenridge, WC, Gombos, G. y Morgan, IG The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 266, 695-707 (1972); Innis, S. M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of nutrition* 137, 855-859 (2007); Salem, N., Jr., Litman, B., Kim, H. Y. & Gawrisch, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945-959 (2001)). A pesar de ser un ácido graso abundante en los fosfolípidos cerebrales, el DHA no puede sintetizarse de novo en el cerebro y debe importarse a través de la barrera hematoencefálica, pero los mecanismos para la absorción de DHA en el cerebro han permanecido enigmáticos. Aquí identificamos a un miembro de la Superfamilia de Facilitadores Principales, el transportador previamente huérfano Mfsd2a que mostramos que se expresa exclusivamente en el endotelio de la barrera hematoencefálica de los micro vasos, como el principal transportador para la absorción de DHA en el cerebro. El análisis lipídico indica que los ratones con deficiencia de Mfsd2a (KO) han reducido drásticamente los niveles de DHA en el cerebro junto con la pérdida de células neuronales en el hipocampo y el cerebelo, y trastornos neurológicos y de comportamiento severos, y un tamaño cerebral significativamente reducido. Sorprendentemente, los estudios basados en células indicaron que Mfsd2a transportaba DHA en forma de lisofosfatidilcolina (LPC), pero no ácido graso no esterificado, de una manera dependiente de sodio. En particular, Mfsd2a transportó LPC de plasma comunes que transportan ácidos grasos de cadena larga como el oleato de LPC y el palmitato de LPC, pero no LPC que tienen menos de una cadena de acilo de 14 carbonos. Además, determinamos que el grupo principal de fósforo-ion híbrido de LPC es crítico para el transporte. Es importante destacar que los ratones KO habían reducido drásticamente la absorción de LPC-DHA marcado y otras LPC desde el plasma al cerebro, lo que demuestra que se necesita Mfsd2a para la absorción cerebral de DHA. Nuestros hallazgos revelan un papel fisiológico esencial inesperado de las LPC derivadas de plasma en el crecimiento y la función del cerebro.

[0028] En base a los hallazgos descritos en el presente documento, se proporcionan composiciones y métodos para la administración mediada por LPC de DHA y ácidos grasos omega-3 a través de la barrera endotelial de sangre, cerebro, ojo y placenta; LPC-DHA, LPC y formulaciones de ácidos grasos omega-3 para nutrición parenteral; sistemas para detectar formulaciones optimizadas de conjugados LPC-nutricionales y otros conjugados; y métodos para el uso de conjugados LPC y otros conjugados para la obtención de imágenes de animales vivos del cerebro y los ojos, y para identificar la propensión a presentar déficits neurológicos.

45 Términos utilizados

[0029] Tal como se usa en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias plurales a menos que el contenido claramente dicte otra cosa.

[0030] El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende a las variaciones abarcan de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

[0031] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica para probar la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en este documento.

[0032] "Vertebrados", "mamífero", "sujeto", "sujeto mamífero" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales tales como conejos, ratas, ratones y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, como ratones, ovejas, perros, vacas, especies de aves, patos, gansos, cerdos, pollos, anfibios y reptiles.

65 LA SUPERFAMILIA IMPORTANTE FACILITADORA (MFS)

[0033] El Superfamilia Importante Facilitadora (MFS) es la mayor familia de transportadores secundarios tanto en

procariotas como eucariotas. La gran mayoría de las proteínas MFS caracterizadas transportan compuestos hidrofílicos y aún no se ha identificado ninguna que transporte lípidos biológicos, y específicamente fosfolípidos (Law, C. J., Maloney, P. C. & Wang, D. N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* 62, 289-305, doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093329 (2008)), que es una función cooptada por la familia de proteínas de transporte ATP Binding Cassette. Mfsd2a es un transportador huérfano clasificado como miembro del MFS 3 (Law, C. J., Maloney, P. C. & Wang, D. N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* 62, 289-305, doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093329 (2008)). En bacterias, el Mfsd2a tiene una homología remota con el simportador de sodio/disacárido, melB, un transportador para la melibiosa bacteriana disacárido. El análisis exhaustivo de la secuencia indica una fuerte conservación filogenética de Mfsd2a del pez al hombre (Berger, J. H., Charron, M. J. & Silver, D. L. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFS2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS One* 7, e50629, doi:10.1371/journal.pone.0050629 (2012)). Mfsd2a de pez se expresa en el cerebro (www.fishbase.org). Utilizando un cribado imparcial en modelos de cultivo celular, Mfsd2a humano se identificó como un receptor para el factor de fusión sincitiotrofoblasto sincitina-2, una proteína derivada de retrovirus que se encuentra en genomas de primates, mientras que Mfsd2a de ratón no se une a sincitinas ni media la fusión celular. Por lo tanto, se sugirió que la función de fusión del Mfsd2a humano es probablemente una función "secundaria" y que su función principal está en el transporte (Esnault, C. et al. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17532-17537, doi:10.1073/pnas.0807413105 (2008)). En estudios separados, Mfsd2a se describió como un gen inducido por el ayuno en el hígado de ratón, pero se expresa de manera alta y constitutiva en el cerebro (Angers, M., Uldry, M., Kong, D., Gimble, J. M. & Jetten, A. M. Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. *The Biochemical Journal* 416, 347-355, doi:10.1042/BJ20080165 (2008)). Encontramos que los niveles basales de Mfsd2a en el hígado de ratón son extremadamente bajos, y la expresión inducida por el ayuno de Mfsd2a en el hígado fue regulada por el regulador maestro del metabolismo de los ácidos grasos PPAR α (Angers, M., Uldry, M., Kong, D., Gimble, J. M. & Jetten, A. M. Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. *The Biochemical Journal* 416, 347-355, doi:10.1042/BJ20080165 (2008)), lo que sugiere que Mfsd2a podría ser involucrado en el transporte de ácidos grasos.

[0034] La familia MFS de las proteínas es enorme, encontrándose miembros a partir de *E. coli* a humano. La mayoría de los miembros de MFS caracterizados conocidos hasta la fecha transportan moléculas hidrofílicas. Se ha demostrado que a pesar de la alta similitud estructural general en la familia MFS, las proteínas MFS logran la especificidad del ligando mediante cambios en relativamente pocos residuos de aminoácidos (Law, C. J., Maloney, P. C. & Wang, D. N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* 62, 289-305, doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093329 (2008)). El mecanismo general de transporte de la familia MFS se ha inferido primero de la estructura de rayos X del transportador de glicerol-3-fosfato GlpT de *E. coli*, y confirmado por las estructuras de otros miembros de la familia MFS (Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., Auer, M. & Wang, D. N. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301, 616-620, doi:10.1126/science.1087619 (2003); Shi, Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annual Review of Biophysics* 42, 51-72, doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130429 (2013)). El modelo ha sido descrito como un modelo de "interruptor basculante" en donde una conformación abierta hacia afuera se une a los ligandos causando un cambio de conformación a la conformación abierta hacia adentro (Shi, Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annual Review of Biophysics* 42, 51-72, doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130429 (2013)). La energía para impulsar este cambio conformacional es proporcionada por la unión de cationes, como el sodio, que fluyen por sus gradientes de concentración. En el caso de Mfsd2a, utiliza sodio para conducir el transporte de LPC. De hecho, Mfsd2a contiene un sitio de unión de sodio conservado que hemos demostrado que es esencial para el transporte de LPC dependiente de sodio. La estructura mínima de ligando del lisolípido que se requiere para el transporte por Mfsd2a es un grupo de cabeza de ion híbrido a base de fosfato y un mínimo de una cadena lateral de alquilo que tiene 14 carbonos. El uso del grupo principal zwitteriónico de LPC como una característica estructural importante del ligando es congruente con el uso de ligandos hidrofílicos para la mayoría de los miembros de la familia MFS. La tolerancia de Mfsd2a para la cadena lateral de alquilo es un nuevo atributo para una proteína MFS. In vivo, Mfsd2a transporta ligandos LPC unidos a la albúmina, pero nuestro estudio muestra que Mfsd2a también puede transportar ligandos LPC disueltos en etanol o en forma de micelas. Por lo tanto, la unión de LPC a la albúmina no es necesaria para el transporte. Proponemos el siguiente modelo simple para el transporte MFSd2a de LPC: 1) LPC primero se absorbe en la valva externa de la membrana plasmática, seguido de difusión lateral y 2) se une a Mfsd2a. 3) El grupo principal de fosfolina se transporta conjuntamente con sodio a través del transportador mientras la cadena lateral de alquilo cuelga del transportador hacia el entorno hidrofóbico circundante de la membrana. Esta configuración finalmente permitiría el movimiento de la cadena del lado del alquilo y la molécula completa de LPC a través de la membrana hacia la valva interna.

[0035] Una secuencia de ADNc representativa que codifica una proteína de Mfsd2a humano se muestra a continuación (SEQ ID NO: 1):

ATGGCCAAAGGAGAAGGCGCCGAGAGCGGCTCCGCGGCGGGGCTGCTACCCACC
 AGCATCCTCCAAAGCACTGAACGCCCGCCAGGTGAAGAAAGAACCGAAAAA
 5 GAAGAAACAACAGTTGTCTGTTTGAACAAGCTTTGCTATGCACTTGGGGGAGCC
 CCCTACCAGGTGACGGGCTGTGCCCTGGGTTTCTTCTTCAGATCTACCTATTGGA
 TGTGGCTCAGGTGGGCCCTTTCTCTGCCTCCATCATCCTGTTTGTGGGCGGAGCCT
 GGGATGCCATCACAGACCCCTGGTGGGCCTCTGCATCAGCAAATCCCCCTGGAC
 CTGCCTGGGTGCCTTATGCCCTGGATCATCTTCTCCACGCCCTGGCCGTCATTG
 10 CCTACTTCTCATCTGGTTCGTGCCCGACTTCCACACGGCCAGACCTATTGGTAC
 CTGCTTTTCTATTGCCTCTTTGAAACAATGGTCACGTGTTTCCATGTTCCCTACTC
 GGCTCTCACCATGTTTCATCAGCACCGAGCAGACTGAGCGGGATTCTGCCACCGCC
 TATCGGATGACTGTGGAAGTGTGGGCACAGTGTGGGCACGGCGATCCAGGGA
 15 CAAATCGTGGGCCAAGCAGACACGCCTTGTTCAGGACCTCAATAGCTCTACAG
 TAGCTTACAAAGTGCCAACCATAACATGGCACCACCTCACACAGGGAAACGC

AAAAGGCATACCTGCTGGCAGCGGGGTCATTGTCTGTATCTATATAATCTGTGC
 TGTCATCCTGATCCTGGGCGTGCGGGAGCAGAGAGAACCCTATGAAGCCAGCA
 GTCTGAGCCAATCGCCTACTTCCGGGGCCTACGGCTGGTCATGAGCCACGGCCCA
 TACATCAAACCTTACTGGCTTCTTCCCTTCCCTTGGCTTTCATGCTGGTGGGA
 20 GGGGAACCTTGTCTTGTGTTTGCACCTACACCTGGGCTTCCGCAATGAATTCCAG
 AATCTACTCCTGGCCATCATGCTCTCGGCCACTTTAACCATTCCCATCTGGCAGTG
 GTTCTTGACCCGTTTGGCAAGAAGACAGCTGTATATGTTGGGATCTCATCAGCA
 GTGCCATTTCTCATCTTGGTGGCCCTCATGGAGAGTAACCTCATCATTACATATGC
 25 GGTAGCTGTGGCAGCTGGCATCAGTGTGGCAGCTGCCTTCTTACTACCCTGGTCC
 ATGCTGCCTGATGTCATTGACGACTTCCATCTGAAGCAGCCCCACTTCCATGGAA
 CCGAGCCCATCTTCTTCTCCTTCTATGTCTTCTTACCAAGTTTGCCTCTGGAGTG
 TCACTGGGCATTTCTACCCTCAGTCTGGACTTTGCAGGGTACCAGACCCGTGGCT
 30 GCTCGCAGCCGGAACGTGTCAAGTTTACACTGAACATGCTCGTGACCATGGCTCC
 CATAGTTCTCATCCTGCTGGGCCTGCTGCTCTTCAAATGTACCCCATGATGAG
 GAGAGGCGGCGGCAGAATAAGAAGGCCCTGCAGGCACTGAGGGACGAGGCCAG
 35 CAGCTCTGGCTGCTCAGAAACAGACTCCACAGAGCTGGCTAGCATCCTCTAG

[0036] Una secuencia de la proteína de Mfsd2a humano representativa se muestra a continuación (SEQ ID NO: 2):

MAKGEGAESGSAAGLLPTSILQSTERPAQVKKEPKKKKQQLSVCNKLKYALGGAPY
 45 QVTGCALGFFLQIYLLDVAQVGPFSASIILFVGRAWDAITDPLVGLCISKSPWTCLGR
 LMPWIIFSTPLAVIAYFLIWFVPDFPHGQTYWYLLFYCLFETMVTCFHVPYSALTMFIS
 TEQTERDSATAYRMTVEVLGTVLGTAIQQQIVGQADTPCFQDLNSSTVASQSANHTH
 GTTSHRETQKAYLLAAGVIVCIYIICAVILILGVREQREPYEAAQQSEPIAYFRGLRLVM
 50 SHGPYIKLITGFLFTSLAFMLVEGNFVLFCTYTLGFRNEFQNLLLAIMLSATLTIPIWQ
 WFLTRFGKKTAVYVGISSAVPFLILVALMESNLIITYAVAVAAGISVAAAFLLPWSML
 PDVIDDFHLKQPHFHGTEPIFFSFYVFFTKFASGVSLGISTLSLDFAGYQTRGCSQPER
 VKFTLNMLVTMAPIVLILLGLLLFKMYPIDEERRRQNKALQALRDEASSSGCSETDS
 55 TELASIL

[0037] En algunas realizaciones, las variantes de las secuencias anteriores se pueden utilizar, incluyendo secuencias de al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos expuestas anteriormente.

[0038] Las variantes funcionalmente activas comprenden variantes funcionalmente activas de origen natural tales como variantes alélicas y variantes de especies y variantes funcionalmente activas de origen no natural que pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de mutagénesis o síntesis directa.

[0039] Una variante funcionalmente activa difiere por aproximadamente, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 residuos de aminoácidos de la secuencia mostrada anteriormente, y sin embargo retiene una actividad biológica.

Cuando esta comparación requiere alineación, las secuencias se alinean para obtener la máxima homología. En Bowie et al., Science, 247: 1306-1310 (1990), se proporciona orientación sobre cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas, que enseña que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio. La primera estrategia explota la tolerancia de las sustituciones de aminoácidos por selección natural durante el proceso de evolución. Al comparar secuencias de aminoácidos en diferentes especies, se pueden identificar las posiciones de aminoácidos que se han conservado entre especies. Es probable que estos aminoácidos conservados sean importantes para la función de la proteína. Por el contrario, las posiciones de aminoácidos en las que las sustituciones han sido toleradas por la selección natural indican posiciones que no son críticas para la función de la proteína. Por lo tanto, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos se pueden modificar mientras se mantiene la actividad inmunogénica específica del péptido modificado.

[0040] La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un clonado de genes para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, se puede usar mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham et al., Science, 244: 1081-1085 (1989)). Los péptidos variantes resultantes se pueden analizar para determinar la actividad biológica específica.

[0041] Según Bowie *et al.*, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes de sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué cambios de aminoácidos pueden ser permisivos en ciertas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos más enterrados o interiores (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que generalmente se conservan pocas características de las cadenas laterales superficiales o exteriores.

[0042] Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para introducir una mutación en los aminoácidos de una proteína. Ver, por ejemplo, Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, EF Fritsch y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0043] Las mutaciones también pueden introducirse usando kits disponibles en el mercado tales como "Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange" (Stratagene) o directamente por síntesis de péptidos. Un experto en la técnica puede realizar la generación de una variante funcionalmente activa de un péptido reemplazando un aminoácido que no influye significativamente en la función de dicho péptido.

[0044] Un tipo de sustitución de aminoácidos que puede ser hecho en uno de los péptidos descritos aquí es una sustitución conservadora de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en donde un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Pearson, Methods Mol. Biol. 243: 307-31 (1994).

[0045] Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptofano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos conservadores preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparaginaglutamina.

[0046] Como alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad PAM250 descrita en Gonnet et al, Science 256: 1443-1445 (1992). Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

[0047] Además, las búsquedas NCBI BLAST se pueden ejecutar por un experto en la técnica para identificar las proteínas que tienen 80% o más identidad de secuencia con las secuencias anteriores.

[0048] Una vez se han preparado secuencias codificantes para las proteínas deseadas, se pueden clonar en cualquier vector adecuado o replicón. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión de elección. Los ejemplos de vectores de ADN recombinante para la clonación y las células huésped que pueden transformar incluyen el bacteriófago λ (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (bacterias gramnegativas), pGV1106 (bacterias gram-negativas), pLAFR1 (bacterias gram-negativas), pME290 (bacterias gram-negativas no *E. coli*), pHV14 (*E. coli* y *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pJ61 (*Streptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), Ylp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y el virus del papiloma bovino (células de mamífero). Ver, Sambrook y *col.*, *Supra; Clonación de ADN, supra; B. Perbal, supra*. El gen puede

colocarse bajo el control de un promotor, un sitio de unión al ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (denominado colectivamente en este documento como elementos de "control"), de modo que la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se transcribe en ARN en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia codificante puede o no contener un péptido señal o una secuencia líder. El anfitrión puede eliminar las secuencias de líder en el procesamiento postraduccional. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

[0049] Otras secuencias reguladoras también pueden ser deseables que permiten la regulación de la expresión de las secuencias proteicas relativas al crecimiento de la célula huésped. Los expertos en la materia conocen las secuencias reguladoras, y los ejemplos incluyen aquellos que provocan que la expresión de un gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Otros tipos de elementos reguladores también pueden estar presentes en el vector, por ejemplo, secuencias potenciadoras.

[0050] Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ligarse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector, tales como los vectores de clonación descritos anteriormente. Alternativamente, la secuencia de codificación puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

[0051] En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de codificación de modo que se puede unir con el control de secuencias con la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura adecuado. También puede ser deseable producir mutantes o análogos de la proteína. Los mutantes o análogos pueden prepararse mediante la eliminación de una porción de la secuencia que codifica la proteína, mediante la inserción de una secuencia y/o mediante la sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como la mutagénesis dirigida al sitio, se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

[0052] El vector de expresión se utiliza entonces para transformar una célula huésped apropiada. Se conocen varias líneas celulares de mamíferos en la técnica e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), tales como, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, riñón de hámster bebé (Células BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), células de riñón embrionario humano (HEK293), así como otras.

[0053] Los vectores de expresión pueden introducirse en células huésped adecuadas por cualquier forma conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transducción por vectores de retrovirus, vectores lentivirales, vectores adenovirales u otros sistemas de vectores virales., *etc.*

ANÁLISIS DE LÍPIDOS

[0054] Como se describe aquí en algunas realizaciones, se realiza el análisis de la composición lipídica de un individuo. Como se usa en el presente documento, el término "lípidos" tiene una intención amplia y abarca una amplia gama de moléculas que son relativamente insolubles en agua o compuestos no polares de origen biológico, incluidas ceras, triglicéridos, ácidos grasos libres, diacilgliceroles, fosfolípidos derivados de ácidos grasos, esfingolípidos, glicolípidos y terpenoides, como retinoides, colesterol, ésteres de colesterol y esteroides. Algunos lípidos son moléculas alifáticas lineales, mientras que otros tienen estructuras de anillo. Algunos son aromáticos, mientras que otros no.

[0055] Tal como se utiliza aquí, el término lípidos "clase" se refiere a una colección de moléculas de lípidos que comparten las propiedades estructurales y/o bioquímicas. Las clases de lípidos adecuadas incluyen clases de lípidos polares y no polares. Las clases de lípidos no polares ejemplares incluyen, sin limitación, los ácidos grasos libres, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos, esteroides y/o ésteres de colesterol. Clases polares ejemplares incluyen, sin limitaciones, las clases de fosfolípidos tales como ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina, cardiolipina y/o lisocardiolipina.

[0056] El término "lipidómica" como se utiliza aquí se refiere a la evaluación de los metabolitos de lípidos en muestras biológicas. El perfil lipídico generalmente implica una evaluación de los metabolitos lipídicos en una o más clases de lípidos (*p. ej.*, ácidos grasos, triglicéridos, diglicéridos, ésteres de colesterol y las clases de fosfolípidos que incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina).

[0057] El término "perfil de lípidos", como se usa aquí se refiere a la evaluación de uno o más lípidos metabolitos dentro de una muestra biológica. En realizaciones particulares, se evalúan dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, doce o más, quince o más, veinte o más, cincuenta o más, 100 o más, o un número aún mayor de metabolitos lipídicos. En realizaciones en las que se evalúan dos o más metabolitos lipídicos, los dos o más lípidos pueden pertenecer a la misma clase o pueden pertenecer a dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más o un mayor número de diferentes clases de

lípidos.

[0058] El perfil de lípidos puede ser cuantitativo, semi-cuantitativo y/o cualitativo. Por ejemplo, el perfil lipídico puede evaluar la presencia o ausencia de un lípido, puede evaluar la presencia de uno o más lípidos por encima o por debajo de un umbral particular, y/o puede evaluar la cantidad relativa o absoluta de uno o más lípidos. En realizaciones particulares, se determina una relación entre dos, tres, cuatro o más lípidos. Los cambios o las perturbaciones en la proporción de lípidos pueden ser ventajosos para indicar dónde hay bloqueos metabólicos (o liberaciones de dichos bloques) u otras alteraciones en las vías metabólicas asociadas con la enfermedad, la respuesta al tratamiento, el desarrollo de efectos secundarios y similares. Los métodos para evaluar las proporciones de precursores de lípidos y productos para evaluar las actividades enzimáticas y el flujo a través de las rutas metabólicas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Attie et al., (2002) J. Lipid Res. 43: 1899-1907 y Pan et al., (1995) J. Clin. Invest. 96: 2802-2808).

[0059] El perfil de lípidos se puede determinar usando cualquier muestra biológica adecuada. La muestra biológica puede tomarse de un sujeto (*p. ej.*, un paciente) y puede ser una muestra biológica derivada central y/o periféricamente, que incluye, sin limitación, muestras de fluidos corporales, tejidos, muestras biológicas celulares, subcelulares y/o extracelulares. Los tejidos y células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, tejido y células del músculo esquelético, tejido y células de la piel, tejido y células neurales que incluyen tejido y células cerebrales, tejido y células de la médula espinal, tejido y células del ojo (por ejemplo, células de la retina) tejido muscular y células cardíacas, tejido y células pulmonares, tejido y células pancreáticas, tejido y células del hígado, tejidos y células del sistema gastrointestinal, tejido y células adiposas, y similares. Las muestras subcelulares incluyen una o más fracciones y/u orgánulos de los tipos de células anteriores, que incluyen, entre otros, citoplasma, núcleos, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, ribosomas, lisosomas, membranas plasmáticas, tracción endosómica y similares. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, entre otros, sangre, plasma, suero, saliva, orina, linfa, semen, lágrimas, leche materna y líquido cefalorraquídeo.

[0060] El perfil de lípidos de la muestra biológica se puede determinar usando cualquier método adecuado. Las diferentes clases de lípidos y los métodos para detectar y opcionalmente cuantificar los mismos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida, espectrometría de masas y RMN, y cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, GC/MS), y similares). Un método adecuado para detectar, y opcionalmente cuantificar, los lípidos en una muestra biológica emplea trazadores de isótopos estables para marcar los lípidos. Se han descrito métodos para obtener perfiles lipídicos a partir de muestras biológicas, véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0143461 A1 (SM Watkins) y Watkins et al. (2002) J. Lipid Res. 43 (11): 1809-17.

[0061] El análisis lipídico puede generar conjuntos de datos de alta densidad que pueden ser evaluados utilizando los enfoques informáticos. Se conocen métodos analíticos informáticos de alta densidad de datos y el software está disponible para los expertos en la materia, por ejemplo, análisis de conglomerados (Pirouette, Informetrix), predicción de clase (SIMCA-P, Umetrics), análisis de componentes principales de un conjunto de datos modelado computacionalmente (SIMCA-P, Umetrics), análisis de conglomerados en 2D (GeneLinker Platinum, software de resultados mejorados) y análisis de la vía metabólica (biotech.icmb.utexas.edu). La elección de paquetes de software ofrece herramientas específicas para preguntas de interés (Kennedy et al., Solving Data Mining Problems Through Pattern Recognition. Indianapolis: Prentice Hall PTR, 1997; Golub et al., (2000) Science 286: 531-7; Eriksson et al., Multi and Megavariate Analysis Principles and Applications: Umetrics, Umea, 2001). En general, cualquier análisis matemático adecuado puede usarse para evaluar uno, dos o más metabolitos lipídicos en un perfil lipídico. Por ejemplo, los métodos como el análisis de varianza multivariante, la regresión multivariada y/o la regresión múltiple se pueden usar para determinar las relaciones entre variables dependientes (*p. ej.*, medidas clínicas) y variables independientes (*p. ej.*, niveles de metabolitos lipídicos). La agrupación en clúster, incluidos los métodos jerárquicos y no jerárquicos, así como el escalamiento dimensional no métrico se pueden utilizar para determinar asociaciones entre variables y entre cambios en esas variables.

[0062] Además, el análisis de componentes principales es una manera común de reducir la dimensión de los estudios, y se puede utilizar para interpretar la estructura de varianza-covarianza de un conjunto de datos. Los componentes principales pueden usarse en aplicaciones tales como la regresión múltiple y el análisis de conglomerados. El análisis factorial se utiliza para describir la covarianza construyendo variables "ocultas" a partir de las variables observadas. El análisis factorial puede considerarse una extensión del análisis de componentes principales, donde el análisis de componentes principales se usa como estimación de parámetros junto con el método de máxima verosimilitud. Además, la hipótesis simple, como la igualdad de dos vectores de medias, se puede probar utilizando la estadística de T cuadrado de Hotelling.

SECUENCIACIÓN DE MUTACIONES

[0063] En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos a partir de muestras de pacientes se secuencian para determinar las mutaciones en el gen Mfsd2a. Se puede usar cualquier técnica para secuenciar ácido nucleico conocida por los expertos en la técnica. Las técnicas de secuenciación de ADN incluyen reacciones clásicas de secuenciación de didesoxi (método de Sanger) usando terminadores o cebadores marcados y separación de gel en

electroforesis en placa o capilar. En una realización, las plataformas de secuenciación de próxima generación (NextGen) se usan ventajosamente en la práctica de la invención. La secuenciación de NextGen se refiere a cualquiera de varios métodos de secuenciación de tipo Sanger postclásicos que son capaces de determinar la secuencia de alto rendimiento. Las plataformas de secuenciación de NextGen pueden incluir: secuenciación por síntesis usando nucleótidos marcados con terminación reversible, secuenciación de pirocálisis, secuenciación 454, hibridación específica de alelo a una biblioteca de sondas oligonucleotídicas marcadas, secuenciación por síntesis usando hibridación específica de alelo a una biblioteca de clones marcados que es seguido por ligadura, monitoreo en tiempo real de la incorporación de nucleótidos marcados durante una etapa de polimerización, secuenciación de colonia, secuenciación de molécula única en tiempo real y secuenciación SOLiD. Los ejemplos de plataformas de secuenciación específicas incluyen: secuenciación 454 (Roche) (Margulies, M et al. 2005, Nature, 437, 376-380); pirosecuenciación, que hace uso de pirofosfato (PPi) que se libera tras la adición de nucleótidos. PPi se convierte en ATP por ATP sulfurilasa en presencia de adenosina 5' fosfosulfato. La luciferasa usa ATP para convertir la luciferina en oxiluciferina, y esta reacción genera luz que se detecta y analiza. Otro ejemplo de una técnica de secuenciación de ADN que se puede utilizar es la tecnología SOLiD (Applied Biosystems). La secuenciación de SOLEXA (Illumina) se basa en la amplificación de ADN en una superficie sólida utilizando PCR plegada y cebadores anclados. Otro ejemplo de una tecnología de secuenciación que se puede utilizar incluye la tecnología de molécula única en tiempo real (SMRT™) de Pacific Biosciences. Otro ejemplo de una técnica de secuenciación que puede usarse es la secuenciación de nanoporos (Soni GV y Meller A. (2007) Clin Chem 53: 1996-2001). Otro ejemplo de una técnica de secuenciación que se puede usar implica el uso de una matriz de transistores de efecto de campo sensibles a químicos (chemFET) para secuenciar el ADN (por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 20090026082).

ANDAMIOS Y CONJUGADOS

[0064] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona andamios para la entrega de compuestos o restos a través de la proteína Mfsd2a. Como se usa en el presente documento, un "andamio" se refiere a cualquier molécula que interactúa o permite el transporte a través de la proteína Mfsd2a. Una interacción incluye transporte, unión, bloqueo, activación o inhibición de la proteína Mfsd2a. En algunas realizaciones, los andamios son andamios de lisofosfatidilcolina (LPC). Tales andamios se pueden usar para el suministro mediado por LPC de ácidos grasos y otras moléculas. En algunas realizaciones, un andamio incluye mínimamente un grupo de cabeza de cabeza zwitteriónica y una cadena de acilo o alquilo. En algunas realizaciones, un andamio incluye mínimamente el grupo de cabeza de fosfolina, el grupo fosfato y una longitud de cadena de acilo o alquilo de al menos 14 carbonos.

[0065] En algunas realizaciones, un andamio puede ser una molécula o modificación de origen natural de la misma. En algunas realizaciones, un andamio puede ser una entidad sintética que normalmente no se encuentra en la naturaleza, siempre que interactúe o sea transportada a través de la proteína Mfsd2a.

[0066] En algunas realizaciones, un compuesto o resto pueden estar unidos a un andamio para formar un "conjugado" para ser transportado a través de la proteína Mfsd2a. En una realización, el carbono omega de la cadena de acilo de la LPC puede modificarse para la unión de compuestos o restos para el transporte. Sin embargo, se puede usar cualquier posición para la unión siempre que la unión no interfiera con el transporte a través de la proteína Mfsd2a. Además, cualquier método, covalente o no covalente, conocido en la técnica para la conjugación puede usarse para unir un compuesto o resto de interés a un andamio.

[0067] Los ejemplos de compuestos o restos que pueden unirse para el transporte pueden incluir, pero no se limitan a, ácidos grasos, un ácido no graso, un fármaco y etiquetas, entre otros.

[0068] En una realización, el compuesto o resto a transportar puede comprender un agente para formación de imágenes como se discute a continuación. En tales realizaciones, la etiqueta puede estar en el andamio o estar en un compuesto o resto que está unido al andamio para el transporte.

AGENTES FORMADORES DE IMÁGENES

[0069] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de LPC para formación de imágenes de animales vivos. Los ejemplos de etiquetas adecuadas para tales aplicaciones incluyen, entre otras, las descritas a continuación.

[0070] La etiqueta puede ser moléculas fluorescentes tales como: xantenos tales como rodaminas, rodoles y fluoresceínas, y sus derivados; bimanos; cumarinas y sus derivados tales como cumarinas de umbeliferona y aminometilo; amins aromáticas tales como dansilo; tintes cuadrados; benzofuranos; cianinas fluorescentes; carbazoles; dicianometilenpiranos, polimetina, oxabenzantrano, xanteno, pirileo, carbostilo, perileno, acridona, quinacridona, rubreno, antraceno, coroneno, fenantreno, pireno, butadieno, estilbeno, complejos de quelatos metálicos lantánidos, complejos de quelatos de metales de tierras raras y derivados de metales de tierras raras, tales como tintes, y complejos de quelatos de metales de tierras raras. Los colorantes fluorescentes se discuten, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 4,452,720, la patente de EE.UU. N° 5,227,487, y la patente de EE.UU. N° 5,543,295.

[0071] En el caso de colorantes de fluoresceína, colorantes típicos de fluoresceína incluyen, pero no se limitan a, 5-carboxifluoresceína, fluoresceína-5-isotiocianato y 6-carboxifluoresceína; se pueden encontrar ejemplos de otros colorantes de fluoresceína, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6,008,379, la patente de EE.UU. N° 5,750,409, la patente de EE.UU. N° 5.066,580, y la patente de EE.UU. N° 4,439,356. Otros ejemplos de tintes de rodamina incluyen tetrametilrodamina-6-isotiocianato, 5-carboxitetrametilrodamina, derivados de 5-carboxi-rodol, tetrametilo y tetraetilamina, difenildimetilo y difenildietilo-rodamina, dinaftilo-rodamina, rodamina-T1 de la marca TEX de sulfato de mercurio. y otros tintes de rodamina. Se pueden encontrar otros colorantes de rodamina, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6,080,852, patente de EE.UU. N° 6,025,505, patente de EE.UU. N° 5,936.087, la patente de EE.UU. N° 5,750,409. Además, también se puede usar un tinte de cianina, tal como, por ejemplo, Cy3, Cy3B, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy 7.

[0072] En algunas realizaciones, el marcador es un isótopo emisor de positrones (p. ej., ^{18}F) para la tomografía por emisión de positrones (TEP), isótopo de rayos gamma (p. ej., $^{99\text{m}}\text{Tc}$) para la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), una molécula o nanopartícula paramagnética (p. ej., quelato de Gd^{3+} o nanopartícula de magnetita recubierta) para imágenes de resonancia magnética (IRM), un fluoróforo de infrarrojo cercano para imágenes de infrarrojo cercano (IR cercano), una luciferasa (luciérnaga, bacteriana, o coelenterato) u otra molécula luminiscente para imágenes de bioluminiscencia.

[0073] En algunas realizaciones, el marcador es un resto radioactivo, por ejemplo un isótopo radiactivo tal como ^{211}A , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{18}F , isótopos radiactivos de Lu y otros.

[0074] Algunos de los compuestos anteriores o sus derivados producirán fosforescencia además de fluorescencia, o sólo se fosforece. Algunos compuestos fosforescentes incluyen porfirinas, ftalocianinas, compuestos poliaromáticos como pirenos, antracenos y acenaftenos, y así sucesivamente. Los marcadores también pueden incluir un desactivador de fluorescencia, tal como, por ejemplo, un grupo de ácido (4-dimetilamino-fenilazo)benzoico (DABCYL).

[0075] Los ejemplos de otras etiquetas incluyen: colorante de indocarbocianina, IRDYE 800CW, ALEXA647, un agente de contraste IRM, y complejo Gd de [4,7,10-tris(carboximetilo)-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-ilo] acetilo.

COMPOSICIONES NUTRICIONALES

[0076] Como se describe en este documento las composiciones nutricionales pueden ser producidas por técnicas de formulación convencionales y técnicas de producción de alimentos.

[0077] La composición nutritiva puede ser útil como un producto farmacéutico, alimentos o bebidas, y similares para aumentar el consumo de energía.

[0078] La composición nutritiva puede administrarse directamente en los intestinos y el estómago de pacientes que muestran la ingestión oral insuficiente, mediante el uso de un tubo de administración, o cuando la ingestión oral es posible, se puede administrar como un alimento o bebida.

[0079] La composición nutritiva puede ser formulada como una preparación líquida tal como un elixir, suspensión, jarabe, emulsión, ampolla; o una preparación sólida tal como gel, goma, gota, polvo, gránulo, píldora, tableta (incluyendo tableta recubierta con azúcar, tableta recubierta con película), cápsula, agente de empaque, polvo y similares.

[0080] Cuando la composición nutricional se puede proporcionar como alimento y bebida, tales productos pueden incluir productos líquidos como bebidas, productos lácteos como leche, bebidas lácteas, yogur, productos de gelatina como bebidas de gelatina, gelatina, productos de goma, productos en polvo, productos granulares, productos de hoja, productos de cápsulas, productos de tabletas, productos sólidos como bocadillos, galletas, y similares.

[0081] Ejemplos de materiales que pueden ser utilizados para formar la composición nutricional como alimento o bebidas incluyen un edulcorante, colorante, conservante, estabilizador espesante, antioxidante, formador de color, fungicida, base de goma, agente amargor, enzima, agente de brillo, acidulante, condimento, emulsionante, agente de mejora, agente para producción, sabor, especias y similares.

[0082] Cuando la composición nutricional se proporciona como alimento y bebida, se puede empaquetar como una sola porción. El empaque de una sola porción se puede usar cuando la cantidad de comida y bebida que se ingiere por comida se determina de antemano. Ejemplos de los mismos incluyen un paquete de porción individual como paquete, bolsa, botella, caja en caso de bebidas, chicle, gelatina, yogur, galleta y similares. El paquete de porción individual puede ser un paquete, una bolsa y similares, en el caso de alimentos en forma de gránulos, polvos, lodos y similares. Particularmente, cuando los alimentos o bebidas se especifican para usos saludables, nutricionales, de uso especial o inválidos, la composición se puede empaquetar como una sola unidad de cantidad, como cuando la composición se debe suspender o disolver en una botella para dar una bebida, etc., para un solo consumo y similares.

[0083] La cantidad de la composición nutricional a ser ingerida por día se puede determinar de forma individual en

función de la edad, el sexo, el peso corporal, el estado de la comida, y similares, y puede ser de aproximadamente 50 kcal-2000 kcal para un adulto por día. Esta cantidad puede ingerirse en aproximadamente 1 a 3 porciones al día. Cuando la composición nutricional se formula en una sola porción de comida o bebida en forma de paquete de una unidad de cantidad de ingestión, la cantidad que se ingiere una vez como se determinó anteriormente puede empaquetarse individualmente.

[0084] Los siguientes ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen para propósitos ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Métodos y Materiales

Productos químicos

[0085] Lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina y otros lisofosfolípidos no radiomarcados se adquirieron de Avanti Polar Lipids. 1-palmitoilo 2-lisofosfocolina (LPC-[³H]palmitato), 1-oleoilo 2-lisofosfocolina (LPC-[¹⁴C]oleato), 1-docosahexaenoilo 2-lisofosfocolina (LPC-[¹⁴C]DHA), y ácido [1-¹⁴C]docosahexaenoico ([¹⁴C]DHA) radiomarcados fueron adquiridos de Americans Radiochemicals. Los lisofosfolípidos, ya sea en cloroformo (no marcado) o etanol/tolueno (radiomarcado) se secaron completamente bajo el gas nitrógeno y se solubilizaron en BSA libre de ácidos grasos al 12% (Sigma), que se disolvió en NaCl 150 mM. Para preparar la mezcla LPC-[¹⁴C]-oleato/LPC-oleato, 25 µCi LPC-[¹⁴C]-oleato (actividad específica 55 mCi/mmol) se secaron y disolvieron en 3 ml de 20 mM LPC no marcado-18:0/BSA. LPC-[³H]-palmitato/LPC-palmitato se prepararon por 25 µCi LPC-[³H]-palmitato disuelto (actividad específica 60Ci/mmol) en 4 ml 10 mM de palmitato LPC. El 1-docosahexaenoilo LPC se preparó a partir de la hidrólisis de 1,2-didocosahexaenoilo PC con veneno de abeja de miel PLA2 (Sigma) en tampón de bórax (pH 8,5) que contiene CaCl₂ 5 mM y se purificó por métodos de TLC. Para preparar la mezcla LPC-[¹⁴C]-DHA/LPC-DHA, se mezclaron 10 µCi LPC-[¹⁴C]-DHA con LPC-DHA/BSA no marcado hasta una concentración final de 10 mM. Para preparar la mezcla [¹⁴C]-DHA/DHA, se mezclaron 50 µCi [¹⁴C]-DHA con DHA/BSA no marcado hasta una concentración final de 12,2 mM.

Animales

[0086] Ratones knockout Mfsd2a se generaron como se ha descrito previamente (Berger, J. H., Charron, M. J. & Silver, D. L. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFS2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. PLoS One 7, e50629, doi:10.1371/journal.pone.0050629 (2012)). Los ratones se mantuvieron con una dieta de alta energía 5LJ5 (PicoLab) que contenía un total de 11% de grasa. Las crías fueron destetadas a las 3 semanas de edad y mantenidas en la dieta de alta energía. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el SingHealth Institutional Animal Care and Use Committee.

Análisis lipídómico

[0087] Para el análisis de lípidos de tejidos, el cerebro, el hígado y el corazón de los ratones WT y KO hembra con la edad de 7-8 semanas nacidos de madres HET, y los cerebros de embriones E18,5 se recogieron y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido hasta extracción. La extracción de lípidos fue seguida por el método de cloroformo/metanol. Para el transporte de ácidos grasos libres a base de células, los lípidos de las células HEK293 que expresan Mfsd2a de ratón y los controles simulados después del tratamiento nocturno con ácidos docosahexaenoico, araquidónico, eicosapentaenoico, alfa-linolénico, linoleico, oleico, palmítico de 100 µm se extrajeron con tampón HIP (hexano: iso-propanol 3:2, por volumen) y se secaron bajo gas N₂. Las especies de fosfolípidos se midieron mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 1100 (Agilent) junto con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo/trampa de iones (4000Qtrap, Applied Biosystem). Los niveles de especies de fosfolípidos individuales se analizaron como se describió anteriormente y se cuantificaron utilizando estándares internos claveteados que incluyen PC-14: 0/14: 0, PE-14: 0/14: 0, PS-14: 0/14: 0 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EE.UU.), y dioctanoilo PI (Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, UT, EE.UU.).

Transporte in vitro de LPC radiomarcados y fluorescentes

[0088] LPC palmitato (LPC-[³H]palmitato), oleato (LPC-[¹⁴C]oleato), y docosahexaenoato (LPC-[¹⁴C]DHA) o TopFluor-LPC, TopFluor-LPE y NBD-LPC radiomarcados se disolvieron en BSA al 12%, que se diluyó en NaCl 150 mM. Los ensayos de absorción de LPC radiomarcados o LPC fluorescentes se probaron usando células HEK293 que sobreexpresan Mfsd2a y construcciones mutantes. Brevemente, las células HEK293 con una confluencia del 90-95% se transfectaron usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) con los plásmidos pcDNA3,1Mfsd2a (WT), pcDNA3,1Mfsd2aD92A (D92A), pcDNA3,1Mfsd2aD96A (D96A) o pcDNA3,1 (simulacro). Los ensayos de absorción se realizaron después de 24 horas de transfecciones. Antes de la incubación del ligando, las células transfectadas con HEK293 se lavaron con DMEM libre de suero antes de los ensayos. Para ensayos dependientes de la concentración y el tiempo, las LPC radiomarcadas se diluyeron en medios DMEM precalentados. Para el ensayo dependiente de sodio, las LPC radiomarcadas se diluyeron en tampón de transporte (KCl 5 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) con NaCl 150

mM o cloruro de colina 150 mM. Para los ensayos dependientes de la concentración de sodio, cualquier reducción en la concentración de NaCl se reemplazó por cloruro de colina para mantener una molaridad catiónica constante de 150 mM. Todos los ensayos se realizaron en placas de 12 pocillos con triplicado y a 37°C.

5 Para los ensayos de transporte de ligando libres de albúmina

10 **[0089]** Para preparar LPC-palmitato disuelto en etanol, 0,75 μ Ci LPC-[³H]palmitato se diluyeron en LPC-palmitato en cloroformo. La mezcla se secó y se disolvió en 50 ml de etanol antes de añadir 6 ml de tampón de transporte con sodio 150 mM como se describió anteriormente para tener palmitato de LPC 50 μ m. Para preparar LPC-palmitato de micelas, LPC-[³H]palmitato 0,75 μ Ci se diluye en LPC-palmitato en cloroformo. La mezcla se secó y se disolvió en 6 ml de tampón de transporte con sodio 150 mM para tener palmitato de LPC 100 μ m y se sonicó en hielo durante 5 minutos. Se añadió carbón activado y se centrifugó para eliminar los monómeros de palmitato de LPC. Los ensayos de transporte fueron similares realizados con células HEK293 que sobreexpresan con plásmido pcDNA3,1Mfsd2a o pcDNA3,1 como control durante 30 minutos a 37°C.

15 Ensayo de transporte de competencia

20 **[0090]** Brevemente, transfección después de 24h de células HEK293 con plásmidos pcDNA3,1Mfsd2a (WT), pcDNA3,1Mfsd2aD92A (D92A), pcDNA3,1Mfsd2aD96A, o pcDNA3,1 (simulacro) se lavaron una vez con medio DMEM libre de suero antes de la adición de una mezcla de 25 μ m de palmitato de LPC radiomarcada y 250 μ m de competidores fríos, que se disolvieron en BSA al 12%. La concentración total de BSA se mantuvo constante en muestras con o sin competidores fríos. Los ensayos se realizaron a 37°C durante 30 minutos. Los ensayos de competencia con otros análogos de LPC, tales como detergentes foscolínicos y PAF se realizaron en las mismas condiciones, excepto durante 15 minutos. El tiempo de reacción reducido fue necesario para limitar los posibles efectos negativos de los detergentes y los lípidos bioactivos sobre la supervivencia celular. Todos los ensayos se realizaron en placas de 12 pocillos con triplicado y a 37°C.

25 Transporte in vivo de LPC radiomarcadas, fluorescentes, y DHA no esterificado

30 **[0091]** Ratones machos y hembras de edad de 6-8 semanas eran inyectados i.v. con 75 μ l de LPC-[¹⁴H]oleato radiomarcado 20 mM, 100 μ l de complejo LPC-[¹⁴C]DHA/BSA 10 mM o 82 μ l de complejo [¹⁴C]DHA/BSA 12,2 mM en un volumen total de 150 μ l de solución salina tamponada con fosfato. A las 2 horas después de la inyección, los ratones fueron anestesiados y perfundidos durante 5 minutos con PBS que contenía 0,5% de BSA para eliminar la sangre y el marcador de lípidos unidos a la vasculatura cerebral. Los tejidos fueron cosechados para la extracción de lípidos. Para la extracción de lípidos, se pesaron los tejidos y se homogeneizaron cantidades similares de tejidos en cloroformo/metanol. Los lípidos de la fase orgánica se mezclaron con centelleo y se contó el centelleo. También se realizaron experimentos similares con una inyección de 300 μ g de NBD-LPC/BSA o 300 μ g de complejo TopFluor-LPC/BSA por ratón. En este experimento, los ratones fueron perfundidos durante 5 minutos con PBS seguido de 15 minutos de perfusión con paraformaldehído al 4% (PFA) para la fijación del tejido. Se prepararon secciones de cerebro de WT y KO con un grosor de 40 μ m y se escanearon usando el modo de fluorescencia verde en el escáner Typhoon FLA 9000 (Agilent). La acumulación de NBD-LPC se expresó como fluorescencia de cada sección por su área. El transporte de DHA en la dieta de la madre al feto también se midió utilizando el complejo [¹⁴C]DHA/BSA. Las hembras embarazadas en e18,5 se calibraron con un bolo de complejo [¹⁴C]DHA/BSA (200 ml de 10 mM [¹⁴C]DHA/BSA/ratón). El cerebro de los fetos se recolectó 20 horas después de la sonda y se pesó. La extracción de lípidos y la radiactividad se realizaron como se describió anteriormente.

35 Análisis por TLC de fosfolípidos

40 **[0092]** Las células HEK293 que sobreexpresan con plásmidos pcDNA3,1Mfsd2a (WT), pcDNA3,1Mfsd2aD92A (D92A), pcDNA3,1Mfsd2aD96A, o pcDNA3,1 (simulacro) o Mfsd2a humana (en plásmido SPORT6) se lavaron una vez con suero medio DMEM exento de antes de la incubación con 50 μ m de LPC [¹⁴C]oleato, LPC [¹⁴C]DHA o con 50 μ m TopFluor-LPC y NBD-LPC radiomarcados. Los lípidos se extrajeron dos veces con tampón HIP durante 30 minutos. Los lípidos se secaron con corriente de nitrógeno y se reconstituyeron en cloroformo y se detectaron en placas de TLC (Milipore). El disolvente para la separación de fosfolípidos fue solución de cloroformo/metanol/amoníaco (25%) (50:25:6, por volumen). Las placas de TLC de fosfolípidos radiomarcados se secaron durante 30 minutos y se expusieron durante la noche a cribados de fósforo y se escanearon con un escáner Typhoon FLA 9000 (Agilent). Las placas de TLC de fosfolípidos fluorescentes se escanearon con el escáner Typhoon FLA 9000 y se cuantificaron usando el software Imagequant.

45 Estudios histológicos

50 **[0093]** Los ratones macho adultos WT y KO de 7,5-8 semanas de edad nacidos de padres Het, fueron profundamente anestesiados y perfundidos transcárdialmente con 50 ml de solución salina, seguido por 100 ml de PFA al 4% en 0,1M PB (pH 7,4) por 30 minutos. Para los embriones, los cerebros se fijaron en 4% de PFA y luego en 30% de sacarosa durante la noche. Las secciones sagitales a 40 μ m de espesor se seccionaron en un criostato, y las secciones en serie se transfirieron a diferentes pocillos de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos para inmunotinción. Secciones

de embriones se incrustaron en portaobjetos. Las secciones del cerebro se procesaron para el procedimiento de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra NeuN (1:1000, Chemicon, CA, EE.UU.), Mfsd2a (1:500), GFAP (1:1000, Chemicon, CA, EE.UU.), Parvalbúmina (1:500, Swant, Suiza), Glut1 (1:500, Abcam), PDGFR-beta (1:150 eBioscience) e incubado durante 5 minutos en 4',6-diaminodino-2-fenilindol (DAPI, 1:5000) antes de lavar y montar. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal de fluorescencia invertido Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss, Pte. Ltd., Singapur). Los mismos procedimientos de localización se realizaron en secciones de hipocampo del macaco de Cynomolgus. El perfil neuronal inmunoteñido de NeuN en el hipocampo y las células de Purkinje teñidas con parvalbúmina en cerebelo se contaron y se indicaron como densidad (número de neuronas inmunopositivas por milímetro cuadrado (No./mm²) y número de células inmunopositivas por milímetro (No./mm) en promedio \pm SEM. La significación estadística se evaluó utilizando la prueba *t* de Student.

Estudios de comportamiento

[0094] Y prueba de alternancia espontánea de laberinto: los ratones fueron colocados en el centro de un laberinto en forma de Y con tres brazos en un ángulo 120° entre sí. Se le permite al animal explorar libremente los tres brazos. Si el ratón tiene una memoria de trabajo espacial intacta, tendría una tendencia reducida a ingresar al brazo visitado recientemente. El programa Topscan (Cleversys Inc., Reston, VA) se usó para calificar el número de entradas en los brazos, y determinar el número de alternancias. Un ratón se considera como haber entrado en un brazo cuando las cuatro extremidades están dentro del brazo.

[0095] Nueva prueba de reconocimiento de objetos: la nueva prueba de reconocimiento de objetos se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. En resumen, los ratones fueron entrenados con objetos "familiares" idénticos durante 5 minutos y luego evaluados a corto plazo (STM) y a largo plazo (LTM), que tuvieron lugar 20 minutos y 24 horas después del entrenamiento, respectivamente. Los episodios de exploración para cada objeto se puntuaron utilizando el programa Annostar (Cleversys Inc., Reston, VA). La puntuación de preferencia se calculó como (Tiempo pasado con un objeto nuevo - Tiempo pasado con un objeto familiar)/(Tiempo total pasado con ambos objetos). Las preferencias por el objeto familiar y el objeto nuevo se definieron como puntuaciones negativas y las puntuaciones cercanas a cero no mostraron preferencia por ninguno de los objetos.

[0096] Pruebas de ansiedad: Todos los aparatos de comportamiento se limpian entre cada animal con desinfectante de superficie y 70% etanol. En el laberinto cero, los ratones se colocaron en el brazo cerrado y se les permitió 10 minutos para la exploración. Los comportamientos, como el tiempo empleado, el número de entradas, el número de transiciones y la latencia entre los brazos abiertos, se puntuaron utilizando el programa de puntuación de comportamiento Annostar (Cleversys Inc., Reston, VA). Además, se registraron comportamientos exploratorios, como la caída de la cabeza y el estiramiento. Al comienzo de la prueba de la caja de luz/oscuridad, los ratones se colocaron en la caja oscura de 20x40x16 cm, y se les permitió moverse libremente entre las cajas de luz y oscuridad durante 10 minutos. Las medidas de comportamiento, como el tiempo pasado y la actividad horizontal en la caja de luz, la latencia para ingresar a la caja de luz y el número de transiciones entre las dos cajas, se registraron utilizando el programa Versamax (AccuScan Instruments Inc., Columbus, OH).

[0097] Actividad de campo abierto: Los ratones se colocaron en la cámara durante 60 minutos y la distancia total recorrida, el número de partes posteriores, y el tiempo empleado en las esquinas y el centro se registraron usando el programa Versamax (AccuScan Instruments, Columbus, OH).

Análisis estadístico

[0098] Las diferencias estadísticas de DHA y los niveles de AA, y los análisis histológicos entre los genotipos se calcularon utilizando una prueba *t* de Student no emparejada. El análisis estadístico de señales LPC-[¹⁴C]DHA, LPC-[³H]palmitato, LPC-[¹⁴C]oleato expresadas como DPM entre simulacro vs WT y mutantes se calcularon utilizando ANOVA de dos vías; a *p* <0,05 se consideró significativo.

[0099] Para los ensayos de comportamiento, el genotipo era el factor entre los sujetos. Se utilizó un ANOVA unidireccional para analizar el laberinto cero, el cuadro claro/oscuro, el campo abierto y el laberinto Y. Se usó un ANOVA de dos vías para analizar la prueba de objeto nuevo, con el día de prueba como factor entre sujetos. Las comparaciones corregidas por pares de Bonferroni se utilizaron como pruebas post-hoc. Los datos se expresaron como promedio \pm SEM y *p* <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

EJEMPLO 1: Inmunolocalización de Mfsd2a

[0100] La inmunolocalización de Mfsd2a indica que está altamente enriquecida en micro vasos vasculares donde se encuentra exclusivamente en el endotelio que constituye el BBB (Fig. 1a, b, c, y Fig.5a, b), pero no se expresa en pericitos que envuelven el endotelio (Armulik, A. et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557-561, doi:10.1038/nature09522 (2010); Bell, R. D. et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409-427, doi:10.1016/j.neuron.2010.09.043 (2010)) (Fig. 5c, d), confirmando un informe anterior que indica que el ARNm de Mfsd2a es una de las transcripciones enriquecidas más altas encontradas en el BBB (Daneman, R. et al. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a

new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* 5, e13741, doi:10.1371/journal.pone.0013741 (2010)). Este patrón de localización en BBB también se observó en el cerebelo y el hipocampo del mono (Fig. 6). Se encontró que *Mfsd2a* se expresaba en el BBB en e15,5 (Fig. 7a). La localización de *Mfsd2a* en el endotelio del BBB sugiere una función de transporte en el BBB.

EJEMPLO 2: Diferencias fenotípicas en ratones *Mfsd2a* knock-out

[0101] Los ratones machos y hembras deficientes en genes *Mfsd2a* (KO) nacieron en proporciones mendelianas, pero habían aumentado significativamente mortalidad postnatal temprana en la vida (Berger, JH, Charron, MJ y Silver, DL Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS One* 7, e50629, doi:10.1371/journal.pone.0050629 (2012)). Se informó que las mediciones fisiológicas y bioquímicas de la salud tisular y sistémica no eran notables en un modelo de ratón *Mfsd2a* KO generado independientemente (Tang, T. et al. Un A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nature Biotechnology* 28, 749-755, doi:10.1038/nbt.1644 (2010)). Consistentemente, los pesos fetales y placentarios de los ratones KO en E18,5 fueron similares a los de la camada WT (Fig. 8a). Además, los ratones KO después del destete exhibieron disfunción motora, (Berger, J. H., Charron, M. J. & Silver, D. L. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS One* 7, e50629, doi:10.1371/journal.pone.0050629 (2012)), con la pata delantera abrochada durante la suspensión de la cola (Fig. 8b). El tamaño y el peso del cerebro de los ratones KO fueron significativamente más pequeños que los de la camada WT (Fig. 9a, b). Sin embargo, no hubo diferencias visibles en la anatomía macroscópica de los cerebros WT y KO (Fig. 9c, d). Curiosamente, el cerebelo de los ratones KO exhibió una pérdida significativa de células de Purkinje (Fig. 1d, e). Además, hubo una disminución significativa en la densidad celular neuronal en el hipocampo, particularmente en las regiones CA1 y CA3, pero la densidad celular normal en el giro dentado (DG) de los ratones KO (Fig. 1f, g). Estos datos sugirieron que los ratones KO podrían tener déficits en el aprendizaje y la memoria. De hecho, las pruebas de comportamiento indicaron que los ratones KO tenían déficits severos en el aprendizaje, memoria a corto y largo plazo, así como ansiedad severa (Fig. 10).

EJEMPLO 3: Análisis lipídico en ratones knockout de tipo salvaje y *Mfsd2a*

[0102] La deficiencia de ácido graso omega-3 se ha relacionado con disfunción cognitiva y ansiedad en modelos de roedores (Lafourcade, M. et al. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neuroscience* 14, 345-350, doi:10.1038/nn.2736 (2011); Carrie, I., Clement, M., de Javel, D., Frances, H. & Bourre, J. M. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *Journal of Lipid Research* 41, 473-480 (2000)). Estos fenotipos KO nos sugirieron que los ratones *Mfsd2a* KO podrían tener reducciones en los niveles cerebrales de ácidos grasos omega-3 y alteraciones en otras especies de lípidos. Realizamos un análisis lipídico completo de cerebro, hígado y corazón mediante espectrometría de masas en ratones WT y KO. Sorprendentemente, encontramos que el DHA, pero no otras especies de ácidos grasos omega-3, en las principales especies de fosfolípidos de PE, PC, PI y PS del cerebro de los ratones KO se redujeron significativamente en comparación con los ratones WT (Fig. 2a y se detalla en la Fig. 11). El DHA se encuentra principalmente como especies de fosfolípidos 38: 6 y 40: 6 en PE, PC, PI y PS (Kim, H. Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 18661-18665, doi:10.1074/jbc.R700015200 (2007)) (Fig. 2a y Fig. 11). El nivel total de especies que contienen DHA no fue significativamente diferente en el hígado y el corazón de los ratones KO en comparación con los ratones WT (Fig. 2d, f y Fig. 11). Sin embargo, el nivel total de DHA en el cerebro de los ratones KO se redujo en aproximadamente 58,8% con cambios menores en otras especies de ácidos grasos (Fig. 2b y Fig. 11). Los cerebros de los ratones KO tuvieron un aumento del 33,8% en el ácido araquidónico en los fosfolípidos (Fig. 2c y Fig. 11), que comúnmente se incrementa en los modelos de roedores con deficiencia de DHA (Simopoulos, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* (Maywood) 233, 674-688, doi:10.3181/0711-MR-311 (2008)). Es de destacar que los ratones KO se cultivaron con una dieta suficiente de DHA, lo que subraya el papel fisiológico de *Mfsd2a* en el mantenimiento de los niveles cerebrales de DHA. A pesar de la falta de cambios anatómicos en los cerebros en desarrollo de los embriones de KO, los cambios bioquímicos en los fosfolípidos cerebrales fueron evidentes en e18,5 con niveles significativamente reducidos de DHA en los fosfolípidos (Fig. 7c), lo que indica que *Mfsd2a* juega un papel esencial en el mantenimiento de los niveles de DHA durante la embriogénesis.

EJEMPLO 4: Transporte de LPC por *Mfsd2a*

[0103] El cerebro acumula selectivamente una gran cantidad de DHA derivado de plasma. En plasma, el conjunto intercambiable de DHA en plasma se encuentra en la albúmina como ácido graso no esterificado o como LPC 17. Usando ensayos basados en células, encontramos que *Mfsd2a* no transportaba DHA no esterificado u otros ácidos grasos no esterificados (Fig. 12, Tabla 1), descartando así a *Mfsd2a* como un transportador de ácidos grasos. Luego probamos si *Mfsd2a* puede transportar DHA en forma LPC. Sorprendentemente, las células que expresan *Mfsd2a* exhibieron una mayor absorción dependiente de la concentración de LPC-[¹⁴C]DHA en relación con las células de control (Fig. 3a), lo que indica que *Mfsd2a* es de hecho un transportador de LPC-DHA. Mutagénesis de alanina de los residuos de aspartato 92 (D92A) y 96 (D96A) críticos conservados filogenéticamente para la unión de sodio en proteínas MFS (Granell, M., Leon, X., Leblanc, G., Padros, E. & Lorenz-Fonfria, V. A. Structural insights into the

activation mechanism of melibiose permease by sodium binding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 22078-22083, doi:10.1073/pnas.1008649107 (2010)) resultaron en una reducción y ausencia de transporte, respectivamente (Fig. 3a). Los mutantes D92A y D96A tenían una expresión similar a la de tipo salvaje (Fig. 13). Luego examinamos la especificidad de transporte de Mfsd2a para las LPC más comunes encontradas en plasma, oleato de LPC y palmitato de LPC. Las células que expresan Mfsd2a de tipo salvaje mostraron una absorción dependiente de la concentración de LPC-[¹⁴C]oleato y LPC-[³H]palmitato (Fig. 3b, c). El Mfsd2a humano también transportó LPC de manera similar (Fig. 14). Una comparación de la absorción mediada por Mfsd2a de LPC-oleato, LPC-palmitato y LPCDHA, indicó que Mfsd2a tenía la mayor capacidad para transportar LPC-DHA, seguido de LPC-oleato y LPC-palmitato (Fig. 3d). Además, las células que expresan el mutante D92A de tipo salvaje y parcialmente activo exhibieron una cinética de saturación con el tiempo (Fig. 15a). Es importante destacar que el transporte dependiente de Mfsd2a de LPC-[¹⁴C]DHA y LPC-[¹⁴C]oleato dio como resultado la rápida conversión de LPC transportados en PC (Fig. 3e, f, g, h). Además, la expresión de Mfsd2a dio como resultado aumentos en la masa de PC que indica que la actividad de transporte de Mfsd2a da como resultado una absorción neta de LPC en las células (Fig. 15b).

[0104] Los miembros de la familia MFS son transportadores facilitadores que utilizan el co-transporte de cationes como Na⁺, H⁺ y Li⁺ por sus gradientes de concentración para conducir el transporte de solutos. Dado el requerimiento del residuo D96 del sitio de unión de catión conservado filogenéticamente para el transporte de LPC como se describió anteriormente, probamos si el transporte por Mfsd2a dependía del sodio. En ausencia de sodio, el transporte de LPC por las células que expresan Mfsd2a de tipo salvaje fue similar a las células transfectadas simuladamente, lo que indica que el transporte de LPC dependía del sodio (Fig. 3i). De acuerdo con las características de otros simportadores MFS dependientes de sodio, el transporte es altamente sensible a bajas concentraciones de sodio, lo que indica una alta afinidad por el sodio (Fig. 3k) (Paroder-Belenitsky, M. et al. Mechanism of anion selectivity and stoichiometry of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 17933-17938, doi:10.1073/pnas.1108278108 (2011)). El transporte de LPC no dependía del pH o del litio (Fig. 16a, b). Además, ambos LPC-[³H] 16:0 solubilizados en etanol o en micelas fueron transportados por Mfsd2a, aunque con menor capacidad en comparación con la forma unida a BSA, lo que indica que la albúmina no es esencial para el transporte (Fig. 16c). Nuestros hallazgos revelan que Mfsd2a es el primer transportador facilitador identificado para el transporte de fosfolípidos.

EJEMPLO 5: Especificidad de ligando y requisitos para el transporte por Mfsd2a

[0105] Luego buscamos determinar la especificidad del ligando y las características químicas de los ligandos LPC que se requieren para el transporte por Mfsd2a. Para llevar a cabo este objetivo, establecimos ensayos de competencia utilizando células que expresan Mfsd2a o células de control simuladas, y las tratamos con palmitato de LPC-[³H] 25 μm en presencia o ausencia de un exceso de 10 veces del competidor no marcado. Descubrimos que un LPC con una longitud mínima de cadena de acilo de 14 carbonos puede competir efectivamente por la absorción (Fig. 17a, b, c). Los lisofosfolípidos LPE y LPS mostraron una competencia débil, mientras que LPA no era competitiva para el transporte de LPC-[³H]palmitato (Fig. 17c). Confirmamos que Mfsd2a puede transportar LPE directamente usando LPE fluorescente (Fig. 18). Estos resultados indican que la carga zwitteriónica del grupo de cabeza de fosfatidilcolina es crítica para el transporte de ligandos. Además, los ácidos grasos de cadena corta y la glicerofosfatidilcolina solos no eran un competidor (Fig. 17b, c), lo que respalda la conclusión de que una cadena larga de acilo de LPC es un requisito para el transporte de ligandos. El lisoplasmalógeno, el factor de activación de lisoplaquetarios y el factor de activación de plaquetas fueron fuertes competidores, lo que indica que el grupo carbonilo de la cadena de acilo de LPC no es necesario para el transporte (Fig. 17d, e, f). La lisofingomielina también compitió por el transporte de LPC-[³H]palmitato, lo que indica que la columna vertebral de glicerol no es necesaria para la función del ligando (Fig. 17f). Similarmente a la LPA, la esfingosina-1-fosfato no era un competidor (Fig. 17f), lo que respalda aún más la conclusión de que la porción de colina del grupo de cabeza de fosfocolina es esencial para el transporte de ligandos. Con el uso de detergentes similares a los lípidos, confirmamos que la cadena lateral de acilo de una longitud mínima de 14 carbonos y el grupo de cabeza de fosfocolina, pero no la columna vertebral de glicerol y el grupo carbonilo, son características químicas esenciales del ligando LPC (Fig. 17g, h).

EJEMPLO 6: Requisito de Mfsd2a para el transporte de LPC-DHA al cerebro

[0106] A continuación, buscamos determinar si se requiere Mfsd2a para el transporte de LPC-DHA al cerebro. Mfsd2a KO y ratones de camada de tipo salvaje fueron inyectados por vía intravenosa con LPC-[¹⁴C]DHA. Sorprendentemente, los ratones Mfsd2a KO tuvieron una reducción en la captación cerebral de LPC-[¹⁴C]DHA en más del 90% en comparación con los controles de tipo salvaje (Fig. 4a). En contraste, la captación de LPC-[¹⁴C]DHA en tejidos periféricos de ratones KO no disminuyó en comparación con los controles de tipo salvaje (Fig. 4a, b). Como el DHA no esterificado puede ser absorbido por el cerebro mediante difusión (Rapoport, S. I., Chang, M. C. & Spector, A. A. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. J Lipid Res 42, 678-685 (2001)), probó si la vía de difusión de la absorción de DHA está alterada en ratones Mfsd2a KO. La captación cerebral de [¹⁴C]DHA no esterificado fue inferior significativamente con relación a la captación de LPC-[¹⁴C]DHA, pero no se redujo en KO relativo a los ratones de tipo salvaje (Fig. 19). Juntos, estos hallazgos representan un vínculo causal con los bajos niveles de DHA en el cerebro en ratones Mfsd2a KO, y respaldan la conclusión de que Mfsd2a es un transportador fisiológico para la captación de LPC-DHA en el cerebro.

[0107] De acuerdo con estudios de cultivo de células que indican que Mfsd2a también puede transportar LPC de plasma comunes, absorción de cerebro de LPC-[¹⁴C]oleato se redujo notablemente en ratones KO (Fig. 4b). En un enfoque separado para probar el transporte in vivo de LPC por Mfsd2a, examinamos el transporte de NBD-LPC, un análogo fluorescente de LPC (Fig. 4c). Primero validamos en las células que NBD-LPC es transportado por Mfsd2a. Similarmente a las LPC nativas, NBD-LPC fue transportado por Mfsd2a, pero el transporte fue reducido por D92 y ausente en mutantes D96, respectivamente (Fig. 4d). Es importante destacar que NBD-LPC fue bioincorporado en fosfolípidos de membrana (Fig. 4e, f). Además, el exceso de LPC nativo compitió por la absorción de NBD-LPC (Fig. 4e, f). Luego probamos el transporte in vivo. Ratones Mfsd2a KO y de tipo salvaje fueron inyectados por vía intravenosa con la misma dosis de NBDLPC y las secciones del cerebro fueron examinadas para la acumulación de fluorescencia. De acuerdo con el transporte de ligandos nativos, la fluorescencia de las secciones de los cerebros KO se redujo significativamente en comparación con los controles de tipo salvaje (Fig. 4g, h), lo que indica que esa captación cerebral de NBD-LPC depende de Mfsd2a. Se obtuvieron hallazgos similares tanto en cultivo celular como in vivo usando TopFluor-LPC, un fluoróforo estructuralmente diferente al NBD-LPC (Fig. 20).

EJEMPLO 7: Estudios sobre el rescate de ratones knock out con Mfsd2a mediante tratamiento dietético con DHA

[0108] Probamos si los ratones KO pueden ser rescatados mediante tratamiento dietético con DHA. El tratamiento dietético con DHA de ratones heterocigotos Mfsd2a desde antes del embarazo hasta la lactancia, y el tratamiento con DHA en las crías destetadas hasta las 8 semanas de edad no rescató los fenotipos KO, como el tamaño del cerebro y la ansiedad (Fig. 21a-e). Es importante destacar que la absorción cerebral de DHA en la dieta por los embriones de KO en e18,5 se redujo drásticamente en comparación con los embriones de tipo salvaje (Fig. 21), lo que concuerda con los niveles reducidos de DHA cerebral en los embriones de KO (Fig. 7b), e indica que es probable que una falta de rescate sea causada por el papel esencial de Mfsd2a durante la embriogénesis para el transporte de DHA al cerebro.

[0109] En conjunto, el estudio actual identifica el transportador huérfano Mfsd2a como un cotransportador de sodio/LPC, y representa el principal mecanismo por el cual DHA entra en el cerebro, e indica por primera vez un importante papel fisiológico de LPC derivados de plasma para crecimiento y función normal del cerebro. Dados estos hallazgos, proponemos cambiar el nombre de Mfsd2a a simportador 1 de sodio/LPC (NLS1).

EJEMPLO 8: Formulaciones de LPC para nutrición parenteral

[0110] Los hallazgos descritos en este documento indican que la vía principal por la cual el cerebro toma los ácidos grasos omega-3 es a través de su conjugación natural a LPC y el transporte al cerebro por Mfsd2a. Los triglicéridos que contienen ácidos grasos omega-3 y ácidos grasos no conjugados no son transportados por esta vía principal y, por lo tanto, son absorbidos principalmente por el hígado y otros órganos. Además, los ratones deficientes en Mfsd2a exhiben cerebros pequeños y déficits neurológicos, y son deficientes en DHA cerebral. Podemos concluir que la absorción cerebral de los ácidos grasos LPC como el LPC-DHA y otros ácidos grasos LPC comunes son esenciales para el crecimiento y funcionamiento normal del cerebro. Es importante destacar que el estándar de atención para la NP pediátrica no proporciona ácidos grasos LPC y LPC-DHA, que son necesarios para el crecimiento y la función normal del cerebro.

[0111] Por lo tanto, las LPC pueden ser producidas y probadas para ver si la adición de LPC como suplementos a la NP dará como resultado mejores resultados en los recién nacidos en la UCIN. Los niveles de LPC en el suero humano normal son de aproximadamente 100-200 μ m (7-9 μ mol/kg) y circulan en la albúmina (Barber MN, et al. (2012) Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. PLoS One 7(7):e41456; Croset M, Brossard N, Polette A, & Lagarde M (2000) Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. Biochem J 345 Pt 1:61-67). Las LPC más abundantes en el plasma humano son el palmitato de LPC, el estearato de LPC y el oleato de LPC. Nuestro enfoque es purificar mezclas de LPC del material que contiene los LPC enumerados anteriormente más LPC que tienen ácidos grasos omega-3 y omega-6 (DHA, EPA, ARA). Estos últimos ácidos grasos poliinsaturados se han relacionado con el desarrollo y la función del cerebro en humanos (Kidd PM (2007) Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic 12(3):207-227; Horrocks LA & Yeo YK (1999) Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society 40(3):211-225; Mozaffarian D & Wu JH (2011) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. Journal of the American College of Cardiology 58(20):2047-2067; Connor WE (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. The American journal of clinical nutrition 71(1 Suppl):171S-175S)). Una posible fuente de estas LPC son los huevos de gallina enriquecidos en ácidos grasos omega-3 y 6, que actualmente están disponibles en el mercado. Por lo tanto, se puede purificar una mezcla de LPC y luego usar esta mezcla en nutrición parenteral (NP) para evaluar los resultados en ensayos clínicos. La mayoría de los resultados de los recién nacidos se pueden medir dentro de los primeros 9 meses de vida. Estos incluirán un mejor crecimiento del cuerpo y la circunferencia de la cabeza mientras están en la UCIN y después de la liberación de la UCIN, y el monitoreo de los hitos normales del desarrollo.

[0112] En base a las divulgaciones en el presente documento, se pueden formular suplementos para NP, tal como se muestra a continuación.

Ejemplo de composición de una formulación de LPC para nutrición parenteral.

	LPC	μM	%
5	Componente 1	LPC-16	37 33,4841629
	Componente 2	LPC-18	14 12,6696833
	Componente 3	LPC-18: 1	10 9,04977376
10	Componente 4	LPC-18: 2 n-6	20 18,0995475
	Componente 5	LPC-20: 4 n-6	4 3,6199095
	Componente 6	LPC-22,6 n-3	25 22,6244344
	Componente 7	LPC-20: 5 n-3	0,5 0,45248869
15		Total	110,5

[0113] Se muestran arriba los intervalos de concentración potencial de cada uno de los siete (7) componentes LPC, 0,5 μm a 200 μm , para usarse como suplemento en NP (basado en el análisis cinético del transporte por Mfsd2a expresado en células humanas como se muestra en la Fig. 4, arriba). Dichas formulaciones pueden solubilizarse con albúmina humana (derivada de la expresión recombinante o de cualquier fuente comercial) como vehículo para generar una composición nutricional. Además, las mezclas o suplementos de LPC se pueden proporcionar solos y en combinación con fórmulas lipídicas NP actuales como Intralipid™, SMOFKabiven™, Omegaven™ (Fresenius), Lipofundin (B. Braun), ClinOleic™ (Baxter) Liposyn™ (Hospira Inc).

[0114] Las LPC pueden aislarse como una mezcla como LPC o como PC a partir de yema de huevo, purificarse por cromatografía de fase inversa y solubilizarse en albúmina. Las LPC se pueden producir a partir de material de partida de PC utilizando fosfolipasas específicas (como se describe en el presente documento) y se pueden escalar según las necesidades. Las relaciones de cada componente LPC pueden modificarse mediante la adición de LPC individuales purificadas y los intervalos ajustados como se sugiere anteriormente.

[0115] En una realización adicional, también se proporcionan suplementos para nutrición enteral que comprenden formas de PC de las anteriores y otras LPC. En esta realización, se proporcionan PC para administración oral. Tras el consumo, las PC se convertirían en LPC en el hígado y luego cruzarían el BBB a través de la proteína Mfsd2a como se describe.

EJEMPLO 9: Mutaciones funcionales de Mfsd2a en humanos

[0116] Como se discute aquí, DHA es un ácido graso omega-3 esencial para el crecimiento cerebral normal y la función cognitiva (Kidd, P.M. (2007). Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic* 12, 207-227; Horrocks, L.A., y Yeo, Y.K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 40, 211-225.; Mozaffarian, D., y Wu, J.H. (2011). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology* 58, 2047-2067; Connor, W.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 71, 171S-175S)). De acuerdo con su importancia en el cerebro, el DHA está altamente enriquecido en fosfolípidos cerebrales (Breckenridge, W.C., Gombos, G., y Morgan, I.G. (1972). The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 266, 695-707.; Innis, S.M. (2007). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of Nutrition* 137, 855-859)). A pesar de ser un ácido graso abundante en los fosfolípidos cerebrales, el DHA no puede sintetizarse de novo en el cerebro y debe importarse a través de la barrera hematoencefálica (BBB), pero los mecanismos para la absorción de DHA en el cerebro han permanecido enigmáticos. Como se muestra aquí, hemos identificado a un miembro de la Superfamilia de Facilitadores Principales, el transportador previamente huérfano Mfsd2a, que demostramos que se expresa en el endotelio de la barrera hematoencefálica de los micro vasos, como el principal transportador para la absorción de DHA en el feto y cerebro adulto (Nguyen et al. *Nature* 2014; 509: 503-6). El análisis lipídico indicó que los ratones con deficiencia de Mfsd2a (KO) han reducido drásticamente los niveles de DHA en el cerebro acompañados de pérdida de células neuronales en el hipocampo y el cerebelo, y trastornos neurológicos y severos del comportamiento, y un tamaño cerebral significativamente reducido. Sorprendentemente, los estudios basados en células indicaron que Mfsd2a transportaba DHA en forma de lisofosfatidilcolina (LPC), pero no ácido graso no esterificado, de una manera dependiente de sodio. En particular, Mfsd2a transportó LPC de plasma comunes que transportan ácidos grasos de cadena larga como el oleato de LPC y el palmitato de LPC. Es importante destacar que los ratones KO habían reducido drásticamente la absorción de LPC-DHA y otras LPC del plasma al cerebro, lo que demuestra que se necesita Mfsd2a para la absorción cerebral de DHA. Además, nuestros hallazgos revelan un papel fisiológico esencial inesperado de las LPC derivadas de plasma en el crecimiento y la función del cerebro.

[0117] En línea con estos hallazgos en ratones, niños con mutaciones inactivadoras raras en Mfsd2a (Zaki, M.S., Saleem, S.N., Dobyys, W.B., Barkovich, A.J., Bartsch, H., Dale, A.M., Ashtari, M., Akizu, N., Gleeson, J.G., and

Grijalvo-Perez, A.M. (2012). Diencephalic-mesencephalic junction dysplasia: a novel recessive brain malformation. Brain: a journal of neurology 135, 2416-2427) (Fig. 22) exhiben microcefalia severa, hidrocefalia, son parapléjicos y no verbales, lo que demuestra claramente que Mfsd2a es esencial para el crecimiento y la función normal del cerebro en humanos. Es importante destacar que se puede demostrar que las mutaciones Thr159Met y Ser166Leu resultan en transporte inactivo, vinculando el fenotipo de los niños afectados con Mfsd2a inactivo.

[0118] Estos hallazgos aumentan la probabilidad de que los alelos hipomórficos de Mfsd2a provoquen déficits neurológicos tales como déficits en la memoria y el aprendizaje, y trastornos conductuales como la ansiedad. Se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido en codones de Mfsd2a humano en el Proyecto de Secuenciación del Exoma NHLBI (Tabla 4). Más de 12.000 euroamericanos y afroamericanos combinados han sido genotipados. Las mutaciones que se muestran en la Tabla 4 pueden ser mutaciones funcionales que resultan en la inactivación de la actividad de transporte de Mfsd2a y pueden usarse para la detección genética en estas poblaciones.

Tabla 4: Polimorfismos de nucleótido único en codones de Mfsd2a humano

Proyecto de secuenciación de exoma NHLBI. Genotipo de ~12.000 exomas de euroamericanos y afroamericanos.						
http://evs.gs.washington.edu/EVS/						
Humano 2A	SNP	Origen	Frec	Fuente de info	Ratón 2A	
	R114H	EA	1 en 8.000	Sanger	R113H	
	Y147C	AA	1 en 4.000	Sanger	Y151C	
	L168F	AA	1 en 4.000	Sanger	L173F	
		EA	1 en 8.000	Sanger		
(Iguale a S186G)	S173G	AA	0	Sanger	S177G	
		EA	1 en 4.000	Sanger		
	S223L	AA	1 en 4.000	Sanger	S227L	
	V264M	EA	1 en 4.000	Sanger	V268M	
	Q274R	EA	1 en 4.000	Sanger	Q278R	
Y	A281T	EA	1 en 4.000	Sanger		
	R283W	EA	1 en 4.000	Sanger	No en ratón	
(Iguale a G890C)	G284A	EA	1 en 4.000	Sanger	G288A	
(Iguale a C895)	R286W	EA	1 en 8.000	Sanger	R290W	
(Iguale a M350V)	M337V	EA	1 en 8.000	Sanger	M341V	
(Iguale a T371A)	T358A	EA	1 en 8.000	Sanger	T362A	
(Iguale a V387M)	V374M	EA	1 en 4.000	Sanger	V378M	
	K503	EA	1 en 8.000	Sanger	K507	
G28A	L181F	EA	1 en 8.000	Sanger	L172F	
		EA	1 en 4.000	Sanger		
(Dup)	A556G	S186G	EA	1 en 8.000	Sanger	S177G
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	C668T	T223M	EA	1 en 8.000	Sanger	No conservado
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	C707T	S236L	EA	1 en 8.000	Sanger	
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	G829A	V277M	EA	1 en 8.000	Sanger	
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	A860G	Q287R	EA	1 en 8.000	Sanger	Q228R
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	G877A	A293T	EA	1 en 8.000	Sanger	No conservado
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	C886T	R296W	EA	1 en 8.000	Sanger	No conservado
			EA	1 en 4.000	Sanger	
(Dup)	G890C	G297A	EA	1 en 8.000	Sanger	G288A
			EA	1 en 4.000	Sanger	
(Dup)	C895T	R299W	EA	1 en 8.000	Sanger	R290W
			EA	1 en 4.000	Sanger	
	A926G	K309R	EA	1 en 8.000	Sanger	K300R
			EA	1 en 4.000	Sanger	
(Dup)	A1048G	M350V	EA	1 en 8.000	Sanger	M341V
			EA	1 en 4.000	Sanger	

(Continuación)

	(Dup)	A111G	T371A	EA	1 en 8.000	Sanger	T362A
				EA	1 en 4.000	Sanger	
5	(Dup)	G1159A	V387M	EA	1 en 8.000	Sanger	V378M
				EA	1 en 4.000	Sanger	
		C1196T	A399V	EA	1 en 8.000	Sanger	No conservado
				EA	1 en 4.000	Sanger	
10		C1537T	R513W	EA	1 en 8.000	Sanger	R504W
				EA	1 en 4.000	Sanger	
	Mutaciones homocigotas						
		chr.1:40431005 T159M	C>T		Familia egipcia		
15		Chr1:40431162	C>T S166L		Familia libia		

EJEMPLO 10: Las mutaciones inactivadoras en MFSD2A resultan en un síndrome de microcefalia letal

[0119] En este ejemplo, ampliamos los resultados descritos en el Ejemplo 9. Realizamos la secuenciación del exoma en una cohorte de 3396 pacientes con enfermedad de desarrollo neurológico en su mayoría recesiva. Se evaluaron los sueros de ratón lisados con fosfato de lisofosfatidilcolina (LPC) en pacientes y ratones inactivados. Las células se transfectaron con construcciones de ADNc que codifican *MFSD2A* de tipo salvaje o mutante, y se monitorizó la absorción de lípidos.

[0120] Identificamos dos familias con consanguinidad documentada que muestran mutaciones homocigóticas no sinónimas en residuos altamente conservados. Los pacientes mostraron una forma letal de microcefalia con hidrocefalia masiva, convulsiones intratables y parálisis cerebral. Los sueros de pacientes mostraron lípidos LPC elevados, lo que sugiere un defecto en la captación celular. El *MFSD2A* mutante carecía de captación lipídica de LPC *in vitro* en células transfectadas.

[0121] Por lo tanto, las mutaciones de *MFSD2A* producen un síndrome de microcefalia letal característico relacionado con la absorción inadecuada de lípidos LPC esenciales.

Métodos

Supervisión del estudio

[0122] El estudio se realizó de conformidad con las disposiciones de la Declaración de Helsinki. La junta de revisión institucional de la Universidad de California en San Diego y los Comités de Ética del Centro Nacional de Investigación, Egipto y el Hospital de Niños de Trípoli aprobaron el protocolo del estudio. El reclutamiento fue parte de un estudio más amplio de enfermedades del neurodesarrollo que consta de 3396 familias en las que se realizó la secuenciación del exoma para identificar la base genética de la enfermedad. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes del estudio o designados.

Participantes del estudio

[0123] Identificamos dos familias con una presentación similar de microcefalia, cuadriparesia espástica con control deficiente de la cabeza e hipotonía troncal, retraso del desarrollo, discapacidad intelectual y ventriculomegalia, así como hipoplasia del cuerpo calloso y el tronco encefálico (Tabla 5).

Tabla 5: Características clínicas de los miembros afectados de las familias 1422 y 1825.

Identificación del paciente	1422-IV-2	1825-IV-1	1825-IV-2
País de origen	Libia	Egipto	Egipto
Género	F	M	F
Consanguinidad parental	+	+	+
Mutación ADNc	c.497C>T	c.476C>T	c.476C>T
Proteína de mutación	p.S166L	p.T159M	p.T159M
Evaluación			
Peso al nacer (kg)	3,8	2	3,4
Longitud al nacer (cm)	n/a	48	47
HC al nacer (DE)	n/a	-1,5	-0,6
HC en el último examen (DE)	-3,5	-5,3	-6,2
Habla	No verbal	No verbal	No verbal

(Continuación)

5	Marcha Cabeza hacia atrás	No ambulatorio Sin soporte de cabeza independiente	No ambulatorio Sin soporte de cabeza independiente	No ambulatorio Sin soporte de cabeza independiente
	Dismorfismos externos	No obvio aparte de entrecerrar los ojos	talipes equinovarus bilateral	talipes equinovarus bilateral
10	Hallazgos neurológicos			
	Hipotonía	+	+	+
	Ataxia	-	-	-
	Cuadriparesia espástica	+	+	+
15	Hiperreflexia	+	+	+
	Discapacidad intelectual	+	+	+
	Características autistas	-	+	+
20	Otros	Insuficiencia pulmonar recurrente	Disfagia recurrente	Disfagia recurrente
	Convulsiones			
	Convulsiones	+ (Clónica)	+ (Tónica)	+ (Tónica)
25	Inicio convulsiones	2 años	7 días	30 días
	Hallazgos de IRM			
	Ventrículos	Enormemente dilatados	Enormemente dilatados	Enormemente dilatados
	Cerebelo	Atrofia/hipoplasia	Atrofia/hipoplasia	Atrofia/hipoplasia
	Corteza cerebral	Borramiento, cuerpo calloso fino	Borramiento, cuerpo calloso fino	Borramiento, cuerpo calloso fino
30	Tronco encefálico	Hipoplástico	Hipoplástico	Hipoplástico
	Abreviaturas. CC circunferencia de la cabeza, IRM resonancia magnética, desviación estándar DE, n/a no disponible.			

35 **[0124]** Cada miembro afectado viviente se evaluó, incluyendo la evaluación general y neurológica, mediciones antropométricas, y revisión de los estudios de imágenes del cerebro. En el momento de la verificación, había un vivo y un fallecido en cada familia. Se obtuvo una muestra de sangre y se usó una alícuota para la extracción de ADN, y se congeló para la posterior evaluación lipídica. La detección metabólica completa de la sangre para detectar enfermedades lisosómicas, peroxisomales y mitocondriales conocidas fue negativa. Todos los miembros afectados

40 sucumbieron por complicaciones de la enfermedad neurológica en los primeros años de vida, atribuidos al fracaso para prosperar y al fallo cardiopulmonar, consistente con una condición letal.

Genotipado y mapeo genético

45 **[0125]** Muestras de ADN de seis (6) individuos que incluían ambos grupos de padres y un miembro afectado en cada familia estaban disponibles para estudios genéticos. Estas muestras fueron parte de un esfuerzo mayor que involucró a 3396 pacientes que se sometieron a investigación genética, incluidos 1349 pacientes egipcios y 93 pacientes libios utilizados como individuos étnicamente compatibles para la comparación del análisis de secuencia. Un individuo de

50 cada familia se sometió a análisis de hibridación genómica comparativa (CGH) y cariotipo, que no detectó anomalías cromosómicas estructurales.

Captura y secuenciación de secuencia dirigida

55 **[0126]** Realizamos una secuenciación de exoma completa (WES) en el miembro afectado de cada familia. En la familia 1825, también realizamos WES de ambos padres, para aumentar la especificidad de los resultados. El ADN genómico se sometió a la preparación de la biblioteca del kit Agilent Human All Exon 50Mb, luego a la secuenciación por pares (2x150 pb) en el instrumento Illumina HiSeq 2000. Para cada muestra de paciente, >90% del exoma se cubrió a >30x. GATK se utilizó para la identificación de variantes (DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat Genet 2011; 43:491-8). Probamos para

60 segregar variantes estructurales raras usando XHMM (Fromer M, Moran JL, Chambert K, et al. Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. American Journal of Human Genetics 2012; 91:597-607). Luego filtramos las variantes homocigóticas utilizando secuencias de comandos personalizadas de Python, para eliminar alelos con más del 0,1% de frecuencia en la población, que no ocurren en intervalos homocigóticos, o sin puntajes altos para el daño probable a la función de la proteína. Se identificaron nuevas

65 mutaciones en el gen *MFSD2A* en las familias 1422 y 1825. Ningún otro miembro de la cohorte mostró variantes deletéreas putativas.

Análisis funcional de mfsd2a

5 **[0127]** Examinamos los efectos de las mutaciones *MFSD2A* en los ensayos de transporte (Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. *Mfsd2a* is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 2014; 509:503-6) y los efectos de las mutaciones introducidas en el *MFSD2A* humano de tipo salvaje (WT) en el rescate del fenotipo MO. El suero de los pacientes se sometió a un análisis lipídómico (Shui G, Stebbins JW, Lam BD, et al. Comparative plasma lipidome between human and cynomolgus monkey: are plasma polar lipids good biomarkers for diabetic monkeys? *PloS One* 2011; 6:e19731). La metodología detallada del análisis funcional se proporciona a continuación.

10 **[0128] Sujetos humanos.** Los pacientes se inscribieron de acuerdo con la práctica local estándar en protocolos de sujetos humanos aprobados en la Universidad de California.

15 **[0129] Secuenciación completa del exoma.** Para cada muestra, se extrajo ADN de leucocitos de sangre periférica mediante extracción de sal. La captura de exón se realizó con el kit Agilent SureSelect Human All Exome 50 Mb y la secuenciación por pares se realizó con los instrumentos Illumina HiSeq2000, lo que resultó en una recuperación de ~94% con cobertura >10x. Las secuencias se alinearon con el genoma humano (hg19) con Burrows-Wheeler Aligner (BWA) y las variantes se delinearón utilizando el software Genome Analysis Toolkit (GATK) y los algoritmos SAMTools para SNP y polimorfismos de inserción/eliminación. Las variantes se filtraron posteriormente por los siguientes criterios: ocurriendo en regiones de codificación y/o sitios de empalme, no sinónimos, encontrados en menos del 0,1% de frecuencia en poblaciones de control (nuestro conjunto de datos exome interno de 5000 individuos, dbSNP y servidor de variantes Exome), homocigotos en familias consanguíneas, dentro de intervalos de enlace o bloques de homocigosidad. Las variantes restantes se clasificaron según el tipo de mutación (sin sentido/empalme/indel>sentido erróneo), conservación de aminoácidos entre especies y programas de predicción de daños (puntuaje de PolyPhen y Grantham). Las variantes se analizaron utilizando un flujo de trabajo de priorización automatizado teniendo en cuenta los patrones de herencia familiar y la gravedad de la variante (sin sentido/empalme/indel>sentido erróneo). Una lista de todas las posibles variantes perjudiciales de pasar este umbral de probabilidad de alelo nulo, puntuación GERP >4, o la puntuación Phastcon >0,8 se ensayaron para determinar la segregación mediante secuenciación de Sanger en toda la familia de exoma error de secuenciación o variantes no pasa el análisis de segregación (es decir: según un modelo de herencia recesivo). Solo aquellos en los que una sola variante perjudicial segregada se marcaron como potencialmente causales. HomozygosityMapper se utilizó para construir mapas de autozigosidad a partir de la secuencia del exoma (Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nurnberg P. HomozygosityMapper: un enfoque interactivo para el mapeo de homocigosidad. *Nucleic Acids Research* 2009; 37: W593-9).

35 **[0130] Secuenciación Sanger.** Los cebadores fueron diseñados usando el programa Cebador3 y probados para especificidad usando el software NIH BLAST. Los productos de PCR se trataron con Exonucleasa I (Fermentas) y Fosfatasa Alcalina de Camarón (USB Corporation) y se secuenciaron usando el Kit de secuenciación del ciclo del terminador Big Dye v,3,1 en un analizador de ADN ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos de secuencia fueron analizados por Sequencher 4,9 (códigos genéticos).

40 **[0131] Mutagénesis de *MFSD2A* humano.** El *MFSD2A* humano de Sport6 (OpenBiosystems) fue PCR usando los cebadores hMfsd2aBamHI y hMfsd2aXbaI (Tabla 8) y clonado en pcDNA3,1 en sitios BamHI y XbaI. Para la mutagénesis de *MFSD2A* p.T159M y p.S166L por PCR, se usaron cebadores específicos (Tabla 6). Los productos de PCR mutados de p.T159M y p.S166L se clonaron posteriormente en pcDNA3,1 y se secuenciaron.

Tabla 6. Cebadores utilizados en este estudio

Primers

hMfsd2aBamHI 5'-tttttGGATCCcaccatggcgaaggagaaggcgccgag-3' (SEQ ID NO:3)
 hMfsd2aXbaI 5'-tttttTCTAGActagaggatgctagccagctctgtggagtc-3' (SEQ ID NO: 4)
 50 T159M-F 5'-CTTTGAAACAATGGTCAtGTGTTTCCATGTTCC-3' (SEQ ID NO: 5)
 T159M-R 5'-GGAACATGGAACACaTGACCATTGTTCAAAG-3' (SEQ ID NO: 6)
 S166L-F 5'-CCATGTTCCCTACTtGGCTCTCACCATGTTC-3' (SEQ ID NO: 7)
 S166L-R 5'-GAACATGGTGAGAGCCaAGTAGGGAACATGG-3' (SEQ ID NO: 8)

55 **[0132] Tratamiento con PNGasa F.** El tratamiento con PNGaseF de *MFSD2A*, p.T159M, p.S166L expresado en células HEK293 se realizó como se describió anteriormente con la excepción de que el tiempo de incubación fue de 3 h (Da Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PloS One* 2010; 5:e13741).

60 **[0133] Modelado de *MFSD2A*.** La estructura 3D de *MFSD2A* fue modelada usando el programa i-Tasser. El mejor modelo para *MFSD2A* es la permeasa de melibiosis bacteriana (MelB) para la cual se resolvió recientemente la estructura atómica (E Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure-based mechanism for Na(+)/melibiose symport by MelB. *Nat Commun* 2014; 5:3009). Los dominios transmembrana y los residuos de *MFSD2A* modelado se visualizaron posteriormente usando PyMol.

65 **[0134] Ensayo de transporte.** El ensayo de transporte con células HEK293 se realizó como se describió

anteriormente (Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. *Mfsd2a* is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 2014; 509:503-6). Brevemente, los plásmidos WT MFSD2A, p.T159M y p.S166L se transfectoron en células HEK293. El ensayo de absorción se realizó después de 24 h de transfección con un rango de oleato de LPC [¹⁴C]. Los experimentos se repitieron dos veces con triplicado en placas de 12 pocillos. La actividad de absorción se expresó como DPM/pocillo. La 1-oleoilo 2-lisofosocolina radiomarcada (LPC [¹⁴C]-oleato se adquirió de ARC y el oleato LPC no radiomarcado se obtuvo de Avanti Polar Lipids, Inc.

[0135] Análisis TLC de fosfolípidos. Células HEK293 que sobreexpresan pcDNA3,1hMfsd2a (WT), pcDNA3,1Mfsd2aT159M (p.T159M), pcDNA3,1Mfsd2aS166L (p.S166L), o pcDNA3,1 (simulacro), los plásmidos se lavaron una vez con medio DMEM sin suero antes de la incubación con 100 µm de LPC [¹⁴C]oleato radiomarcado y se incubaron durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron tres veces con DMEM que contenía 0,5% de BSA. Los lípidos se extrajeron dos veces con tampón HIP (hexanos/isopropanol, relación 3:2) durante 30 minutos, se secaron con corriente de nitrógeno, se reconstituyeron en cloroformo y se mancharon en placas de TLC (Milipore). El disolvente para la separación de fosfolípidos fue solución de cloroformo/metanol/amoníaco (25%) (50:25:6, por volumen). Las placas de TLC de fosfolípidos radiomarcados se secaron durante 30 minutos y se expusieron durante la noche a cribados de fósforo y escaneado con el escáner Typhoon FLA 9000 (Agilent). Las bandas de fosfolípidos se cuantificaron utilizando el software Imagequant y se expresaron como cambio de doblez a simulacro.

[0136] Análisis lipídico de muestras de plasma. Para muestras de plasma humano, muestra de plasma individual del padre, madre y afectados de la familia 1825, y muestras de plasma duplicadas del padre, madre y afectados de la familia 1422 se utilizaron para el análisis LPC. Los lisofosfolípidos se extrajeron utilizando un protocolo basado en metanol descrito anteriormente (Zhao Z, Xu Y. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *J Lipid Res* 2010; 51: 652-9). Brevemente, las muestras de plasma (2 ml) se volvieron a suspender en 200 ml de metanol que contenía 100 pmoles/ml de LPC 20:0 como estándar interno (Avanti Polar Lipids, EE.UU.), Seguido de vórtice de 30 segundos y sonicación de 30 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar los desechos. Los sobrenadantes se diluyeron 5 veces con metanol (volumen total 25 ml) antes de la inyección en LC-MS/MS. Para muestras de plasma de ratón, se extrajeron lisofosfolípidos usando carbón activado. Brevemente, el plasma (150 ml) de 5 WT y 5 KO de camadas de edad de 3,5 meses se diluyó primero con 650 ml de PBS y luego con 800 ml de solución de carbón activado (1 g/50 ml de PBS). Las muestras se rotaron durante 1 hora a 25°C seguido de una centrifugación durante 5 minutos a 10.000 rpm para recoger los gránulos de carbón. Los gránulos se lavaron tres veces con PBS y luego se resuspendieron en 500 ml de PBS. Se añadió una cantidad igual de coloformo/metanol (2:1) a las muestras y se sometió a vórtice riguroso durante 30 minutos a 25°C. La fase orgánica se separó por centrifugación, y la extracción de lípidos se realizó dos veces con coloformo/metanol (2:1) y se secó con gas N₂. Antes del análisis lipídico, los extractos lipídicos secos se resuspendieron en 150 ml de cloroformo/metanol 1/1, y se diluyeron adicionalmente con 200 ml de metanol que contenía 0,91 nmol/ml de LPC 20:0 como patrón interno. Estas soluciones se usaron para inyección en LC/MSMS.

[0137] Análisis de espectrometría de masas. Las muestras fueron aleatorizadas para inyección en LC/MSMS. Cada muestra se analizó por triplicado técnico. Cada análisis de muestra fue seguido por una inyección en blanco para evitar el arrastre. La estabilidad de la señal durante todo el análisis se controló mediante la inyección regular de una muestra de CC. El análisis cromatográfico se realizó en un sistema de cromatografía líquida 1290 (Agilent Technologies, EE.UU.) Utilizando una fase estacionaria Kinetex HILIC (150x2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å, Phenomenex, EE.UU.). Para la elución en gradiente, los disolventes utilizados fueron A: 95% de acetonitrilo/5% de formiato de amonio 10 mM/0,1% de ácido fórmico, y B: 50% de acetonitrilo/50% de formiato de amonio 10 mM/0,1% de ácido fórmico. El gradiente pasó de 0,1% a 75% de B en 6 min, a 90% de B en 1 min, a 0,1% de B en 0,1 min, se mantuvo a 0,1% de B durante 3 min (tiempo de ejecución total de 10,1 min). En estas condiciones, las especies de LPC eluyen a aproximadamente 4,9 min. El caudal fue de 0,5 ml/min. Las especies de LPC se cuantificaron usando el Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM) en un espectrómetro de masas triple cuádruple 6460 (Agilent Technologies, EE.UU.). Las condiciones de la fuente fueron las siguientes: temperatura de gas 300°C, flujo de gas 5L/min, flujo de gas envolvente 11L/min y voltaje capilar 3500V. Las transiciones MRM fueron de iones precursores al fragmento de la cabeza de colina (m/z 184) con una energía de colisión de 29V. Se monitorearon 36 transiciones simultáneamente con un tiempo de permanencia de 20 ms. Los datos de cuantificación se extrajeron utilizando el software MassHunter Quantitative Analysis (QQQ) (Agilent Technologies, EE.UU.). Los datos se seleccionaron manualmente para garantizar la integración correcta de los picos. Las áreas bajo curva (AUC) de los picos de cromatograma de iones extraídos para cada transición MRM se extrajeron a excel. El AUC de las especies de lípidos se normalizó al AUC del estándar interno. Las especies LPC totales e individuales de muestras humanas y de ratón se calcularon y expresaron como µm.

[0138] Análisis de LPC [¹⁴C]-oleato en sangre. Los ratones *Mfsd2a* KO y WT se inyectaron por vía intravenosa con LPC [¹⁴C]-oleato marcado con radioactividad de 100 µm. Se recogieron 10 ml de muestras de sangre después de 2 minutos (dosis inicial) y después de 2 horas de la vena de la cola, y la radiactividad se cuantificó por recuento de centelleo. La cantidad de plasma LPC [¹⁴C]-oleato en los ratones KO se expresó como relación con el WT en cada punto de tiempo.

Análisis estadístico

[0139] Realizamos todos los experimentos *in vitro* por cuadruplicado. Los datos se expresan como medias y errores estándar. Utilizamos la prueba t de Student para realizar comparaciones entre grupos (dos colas). Para comparaciones múltiples, realizamos la prueba de Tukey junto con el análisis de varianza utilizando el software GraphPad Prism. Las curvas de Kaplan-Meier se calcularon para la supervivencia después de la inyección de MO a los 1, 2 y 3 días después de la fertilización, independientemente del ARNm inyectado, incluida la no inyección. Las curvas de supervivencia se compararon usando la prueba Log-rank (Mantel-Cox) usando el software GraphPad Prism. Un valor de $p < 0,05$ se consideró indicativo de significación estadística. Todos los valores de p fueron probados como de dos lados.

Resultados

Población de estudio

[0140] Los 3396 pacientes reclutados para el estudio representaban muchas formas raramente individuales de trastornos del desarrollo neurológico, en su mayoría discernibles en base a un curso neurológico estático versus progresivo, la presencia de epilepsia, autismo o discapacidad intelectual, características dismórficas graves o hallazgos sorprendentes. en estudios de diagnóstico como resonancia magnética cerebral, EEG o análisis de química sanguínea. Si bien las dos familias mostraron, en retrospectiva, muchas características similares, incluyendo microcefalia, cuadriparesia mixta hipotónica/espástica, ausencia de control de la cabeza, ataques epilépticos y ventrículos enormemente dilatados, habría sido difícil discernir su presentación clínica del resto de la cohorte, dada la ausencia de hallazgos clínicos inusuales o patognomónicos en las pruebas de rutina.

[0141] Las dos familias, una de Libia y la otra de Egipto, fueron llevadas a atención médica debido a la ausencia de hitos en los primeros 3 meses de vida. De acuerdo con el modo de herencia recesivo, ambas familias demostraron consanguinidad parental de primo hermano, cada una con dos miembros afectados (Fig. 23A), y sin factores de riesgo ambiental para retraso del desarrollo (En Engle PL, Black MM, Behrman JR, et al. Strategies to avoid the loss of developmental potential in more than 200 million children in the developing world. Lancet 2007; 369:229-42). Las características clínicas de los miembros afectados muestran una apariencia normal y parámetros de crecimiento al nacer, a excepción de la microcefalia, pero el retraso del crecimiento constitutivo, las convulsiones y la ausencia de crecimiento de la cabeza se hicieron evidentes en los primeros meses. Hubo una cuadriparesia hipotónica/espástica mixta, dificultad para mantener el control de la cabeza, reflujo gastroesofágico y neumonías por aspiración. El inicio de las convulsiones fue entre los 7 días y los 2 años de edad, y consistió en espasmos clónicos o tónicos que duraron de 3 a 10 minutos, precipitados por la enfermedad. La química sanguínea de rutina fue completamente normal, incluyendo química completa, hemograma completo, velocidad de sedimentación globular, perfil lipídico estándar, lactato/piruvato, cariotipo detallado y espectrometría de masas clínica en tándem para intermedios metabólicos. Los estudios de imágenes del cerebro mostraron hidrocefalia macroscópica, con ventrículos laterales muy dilatados, borramiento de la superficie cortical, hipoplasia/atrofia cerebelosa y del tronco encefálico (Fig. 23B). La hidrocefalia obstructiva fue excluida en base a un Acueducto de Sylvius patentado, y al diagnóstico presuntivo de que la condición representaba una forma de enfermedad de la sustancia blanca profunda hasta ahora desconocida.

Secuenciación del exoma completo

[0142] Filtramos datos de WES en los miembros afectados mediante la eliminación de variantes comunes ($>0,1\%$ de frecuencia de alelos en nuestra base de datos de exoma interna de 5000 individuos, o la base de datos NHLBI de 4000 individuos), y variantes no heterocigotas en padres (Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. Science 2012; 337:64-9). Identificamos variantes raras que alteran las proteínas en cada miembro de la familia. Entre estas variantes, en la familia 1825, solo 4 eran consistentes con el modo de herencia (Tabla 7), y de estos solo 1 pasó el análisis de segregación, que era una variante chr1: 40431005C>T en el gen *MFSD2A*, lo que condujo a un nucleótido c. 476C>T y cambio de proteína p.T159M. Después de esta identificación, buscamos en la base de datos y descubrimos que la familia 1422 albergaba una variante chr1: 40431162C>T en el mismo gen, lo que conducía a un cambio en el nucleótido c.497C>T y el cambio de proteína p.S166L (Fig. 23C). La comparación del fenotipo de las dos familias mostró que coincidían con precisión. Ambas variantes mostraron una alta predicción de daño utilizando programas estándar (Tabla 7, Tabla 8), ocurrieron en bloques de homocigosidad (Fig. 26) y se encontraban en residuos de aminoácidos perfectamente conservados a lo largo de la evolución de los vertebrados, ubicados en el 4º dominio transmembrana de la proteína (Fig. 23D, E). Ambas mutaciones se encontraban en exones empalmados constitutivamente y segregadas en la familia respectiva de acuerdo con un modo de herencia estrictamente recesivo (Fig. 27). Estas variantes no estaban presentes en nuestro conjunto de datos interno de aproximadamente 10.000 cromosomas o en bases de datos disponibles públicamente.

Tabla 7. Variantes genéticas de la familia 1825 de la secuenciación del exoma

chr	posición	dbSNP	ref	mut	gen	funciónGVS	Posición ADNc	AA_Cambio	Puntuación Phast-Cons	Vert Phast-Cons	Puntuación Cons GERP	Distancia al empalme	adhesión
11	2182393	rs3842740	C	CGCAA	EN S	utr-5	0,006			0,006	2,730	2	NM_001185098,1
1	40431005		C	T	MFS2A	missense	c.476C>T	p,T159M	1,000	1,000	5,750	2	NM_032793,3
2	95815141		GT	GRAMO	ZNF514	cambio de marco	C, 1462GT>G	p,H362Sfs * 5 7	0,939	0,376	2,740	871	NM_032788,1
1	32381592		T	TAA	PTP4A2	intrón			0,943	0,993	5,320	2	NM_080391,3

Tabla 8, Variantes genéticas de la familia 1422 de la secuenciación del exoma

chr	posición	dbSNP	ref	mut	gen	funciónGVS	Posición ADNc	AA_Cambio	Puntuación Phast-Cons	Vert Phast-Cons	Puntuación Cons GERP	Distancia al empalme	adhesión
2	131704214		T	G	ARGEF4	intrón	0,454	0,569	1,590	4	NM_032995,1		
5	127710395		A	T	FBN2	missense	c,2021T>A	p,I647N	1,000	1,000	4,180	49	NM_001999,3
14	81259453		T	G	CEP128	missense	c,1211A>C	P,N404T	0,962	0,589	-0,935	2	NM_152446,3
5	169661114		A	G	C5ORF58	intrón	0,001	0,001	-0,058	3	NM_001102609,1		
12	86374869		C	T	IMMT	missense	c,1489G>A	p,V497I	1,000	1,000	4,820	45	NM_006839,2
14	71570306		C	G	PCNX	missense	c,6015C>G	p,S2005R	1,000	1,000	4,320	81	NM_014982,2
1	40431162		C	T	MFSD2A	missense	c,497C>T	P,166L	1,000	1,000	5,310	20	NM_032793,3
5	115336146		G	A	AQPEP	missense	c,1532G>A	p,R511G	0,749	1,000	2,770	17	NM_173800,4

Efecto de la mutación en la función *mfsd2a*

[0143] Como se discutió aquí, MFSD2A codifica una proteína transmembrana de 12 pasadas recientemente implicada en la formación y función del BBB y requerida para el transporte de DHA en ratones (Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. *Mfsd2a* is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 2014; 509:503-6; Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, et al. *Mfsd2a* is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* 2014; 509:507-11). La expresión de MFSD2A en células HEK293 se resuelve en SDS-PAGE como dos isoformas, ~55kDa y ~70kDa, debido a la glucosilación en los residuos N217 y N227 (Berger JH, Charron MJ, Silver DL. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PloS One* 2012; 7:e50629). Las mutaciones p.T159M y p.S166L se introdujeron en la proteína humana MFSD2A, se expresaron en células HEK293 y se examinaron por inmunofluorescencia y transferencia Western. Ambos se expresaron a niveles similares y mostraron modificaciones postraduccionales idénticas a WT, que se resolvieron en entidades de menor peso molecular después del tratamiento con glucosidolasa PNGasa F (Fig. 24A). Además, ambas proteínas mutantes se expresaron de manera estable y se localizaron parcialmente en la membrana plasmática de una manera similar a WT (Fig. 24B). Para proporcionar una base molecular para las mutaciones inactivadoras, aprovechamos la información estructural de MelB, la parte transportadora de *E. coli* sodio-melibiosa de la familia MFS y compartimos una gran similitud de secuencia con *Mfsd2a*. Tanto p.T159 como p.S166 residen en el dominio transmembrana 4, que comunica la unión de sodio y ligando, respectivamente (Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure-based mechanism for Na⁽⁺⁾/melibiose symport by MelB. *Nat Commun* 2014; 5:3009; Cordat E, Leblanc G, Mus-Veteau I. Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of *Escherichia coli* melibiose permease. *Biochemistry* 2000; 39:4493-9). El residuo humano p.T159 se conserva en el residuo p.T221 de MelB y se predice que la mutación p.T159M interrumpe la interacción de unión de sodio mientras que p.S166 no se conserva en MelB (p.W228) y se predice que la mutación p.S166L interferirá con unión LPC (Fig. 24C).

[0144] Para evaluar el deterioro funcional, utilizamos un ensayo basado en células con un rango de concentraciones de LPC-[¹⁴C]DHA, LPC-[¹⁴C]oleato y LPC-[¹⁴C]palmitato (Fig. 24D- F) después de la transfección en células HEK293. Tanto los mutantes p.T159M como p.S166L estuvieron en gran parte inactivos, exhibiendo una actividad de transporte similar a la del fondo en células transfectadas simuladas para todos los lípidos LPC probados, lo que indica que las mutaciones deterioran la función de MFSD2A como transportador LPC. Las LPC captadas por las células HEK293 se esterifican en fosfatidilcolina (PC) por las enzimas lisofosfatidilcolina aciltransferasas (LPCAT) celulares, y proporciona evidencia bioquímica adicional para la captación celular. Por lo tanto, MFSD2A y las construcciones mutantes se evaluaron para la conversión de LPC a PC (Fig. 24G-I). Las células que expresan WT MFSD2A mostraron una conversión significativamente mayor de LPC exógena en PC de membrana en comparación con las células que expresan mutantes p.T159M y p.S166L, consistente con la pérdida de la función de transporte en mutantes (Fig. 24F, G).

Efecto de las mutaciones *mfsd2a* en los niveles plasmáticos de lpc

[0145] Presumimos que la captación de lípidos plasmáticos por MFSD2A en el BBB afecta los niveles plasmáticos de LPC, de modo que la deficiencia de *MSFD2A* debería aumentar los niveles plasmáticos de LPC. De hecho, encontramos que los ratones *Mfsd2a* KO mostraron que los niveles totales de LPC en plasma aumentaron en un 40% en comparación con los controles (Fig. 25A). Los ratones *Mfsd2a* KO también habían aumentado los niveles de LPC individual en comparación con los controles (Fig. 25B). Otras especies de LPC en plasma menos abundantes, como LPC-DHA, mostraron una tendencia hacia niveles aumentados en ratones *Mfsd2a* KO (Fig. 25B). De acuerdo con el aumento de los niveles plasmáticos de LPC en estado estacionario en ratones *Mfsd2a* KO, y con el hallazgo de que la absorción cerebral de LPC en ratones *Mfsd2a* KO se redujo entre 85-90% dependiendo de la especie LPC, estudios de seguimiento de LPC-[¹⁴C]oleato inyectados por vía intravenosa mostraron niveles aumentados de LPC-[¹⁴C]oleato en plasma en ratones *Mfsd2a* KO a las 2 horas después de la inyección (Fig. 25C). Dados estos resultados, probamos si los pacientes tenían niveles plasmáticos aumentados de LPC en relación con padres heterocigotos y controles sanos de la misma edad. El análisis lipídico indicó que las LPC plasmáticas totales aumentaron en los probandos en relación con sus padres y controles heterocigotos (Fig. 25D). Similarmente a los hallazgos en ratones *Mfsd2a* KO, las especies de LPC de plasma comunes que contienen ácidos grasos de longitud 16:0, 18:0, 18:1 y 18:2 aumentaron en los sueros de pacientes mutantes *MSFD2A*, lo que sugiere un defecto en la captación de LPC (Fig. 25E).

EJEMPLO 11: Modelado de mutaciones humanas de MFSD2A

[0146] Aprovechamos la información estructural detallada de MelB para proporcionar una base molecular para las mutaciones inactivadoras p.T159M y p.S166L. El mecanismo general de transporte de la familia MFS se ha inferido primero de la estructura de rayos X del transportador de glicerol-3-fosfato GlpT de *E. coli*, y confirmado por las estructuras de otros miembros de la familia MFS y más recientemente incluyendo MelB, un ortólogo cercano de MFSD2A (Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure-based mechanism for Na⁽⁺⁾/melibiose symport by MelB. *Nat Commun* 2014; 5:3009; Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 2003; 301:616-20; Shi Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys* 2013; 42:51-72). El modelo se ha descrito como un modelo "interruptor basculante, acceso alterno" en donde una conformación abierta

5 hacia afuera se une a los ligandos causando un cambio de conformación a la conformación hacia adentro-abierta (Shi Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys* 2013; 42:51-72). La energía para impulsar este cambio conformacional es proporcionada por la unión de cationes que fluyen por sus gradientes de concentración. En el caso de MFSD2A, utiliza sodio para conducir el transporte de LPC. De hecho, MFSD2A contiene un sitio de unión al sodio conservado que se ha demostrado que es esencial para el transporte de LPC dependiente del sodio (Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. *Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid*. *Nature* 2014; 509:503-6).

10 **[0147]** Una explicación molecular para la pérdida de la función de p.T159M en los niños afectados puede deducirse de la estructura de resolución atómica de MelB. La alineación de secuencia de MFSD2A humano y MelB indicó la conservación de T159 con T121 en MelB. T121 en MelB se enfrenta al sitio de unión de sodio y forma enlaces de hidrógeno con el residuo de unión de sodio D59, que es equivalente a D97 en MFSD2A humano (Fig. 24C). Tanto el T121 como el D59 son necesarios para el transporte MelB (Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure-based mechanism for Na(+)/melibiose symport by MelB. *Nat Commun* 2014; 5:3009) El enhebrado de la secuencia MFSD2A humana en el modelo MelB reveló que T159 en humanos también está muy cerca del residuo de unión a sodio D97, que es equivalente a D96 en MFSD2A de ratón y esencial para la función (Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. *Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid*. *Nature* 2014; 509:503-6). Similarmente a p.T159M, p.T121A en MelB no es funcional. Por lo tanto, se predice que la mutación p.T159M interrumpe la unión del sodio y evita el transporte del ligando. La mutación p.S166L tampoco es funcional, y el niño afectado es una fenocopia clínica de los niños que tienen la mutación p.T159M. Curiosamente, p.T159M y p.S166L residen en el dominio transmembrana 4 (TMD4), que se ha propuesto para comunicar la unión de ligando y sodio (Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure based mechanism for Na(+)/melibiose symport by MelB. *Nat Commun* 2014; 5:3009; Cordat E, Leblanc G, Mus-Veteau I. Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of Escherichia coli melibiose permease. *Biochemistry* 2000; 39:4493-9). El residuo S166 se conserva en todos los vertebrados secuenciados, pero no se conserva en MelB. Además, el residuo S166 se enfrenta a la cavidad de transporte (Fig. 24C), lo que sugiere un papel en la unión del ligando. De hecho, el residuo correspondiente S166 en MelB, W128, es crítico para el transporte de melibiosa (Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, Leblanc G, Kaback HR, Guan L. Structure-based mechanism for Na(+)/melibiose symport by MelB. *Nat Commun* 2014; 5:3009; Cordat E, Leblanc G, Mus-Veteau I. Evidence for a role of helix IV in connecting cation- and sugar-binding sites of Escherichia coli melibiose permease. *Biochemistry* 2000; 39:4493-9). Por lo tanto, se predice que el residuo S166 desempeñará un papel en la unión del sustrato al formar potencialmente un enlace de hidrógeno con el grupo principal de fosforilcolina de LPC.

35 **[0148]** Los estudios descritos en los Ejemplos 9, 10 y 11 establecen una asociación entre transporte de ácidos grasos omega 3 y crecimiento del cerebro en seres humanos. Las dos familias consanguíneas que identificamos que albergan mutaciones inactivadoras en MFSD2A exhibieron un síndrome de microcefalia letal que se presenta en los primeros tres (3) meses de vida con hidrocefalia masiva, cuadriparesia espástica y epilepsia. El análisis de lípidos apuntó a niveles elevados de LPC en suero, probablemente como resultado de la absorción celular fallida debido a la falta de actividad de MFSD2A. La gravedad del fenotipo general de los pacientes fue mayor de lo que se hubiera predicho del ratón knockout, que sobrevivió, exhibiendo microcefalia, ataxia, déficit de memoria y aprendizaje, y ansiedad (Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. *Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid*. *Nature* 2014; 509:503-6).

45 **[0149]** Si bien se han descrito e ilustrado aspectos específicos de la invención, dichos aspectos deben considerarse ilustrativos de la invención solamente y no tan limitantes de la invención como se interpreta de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. A la luz de las enseñanzas de esta especificación será evidente para un experto en la materia que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar uno o más compuestos o ácidos grasos para determinar el transporte mediado por lisofosfatidilcolina (LPC) del uno o más compuestos o ácidos grasos a través de la proteína Mfsd2a, en donde el uno o más compuestos o ácidos grasos comprende un grupo de cabeza zwitteriónica y una cadena de acilo o alquilo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una mezcla biológica que comprende dicho uno o más compuestos o ácidos grasos con un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma una alteración homocigótica del gen Mfsd2a (ratón KO) y un ratón de tipo salvaje;

(b) medir la cantidad de dicho uno o más compuestos o ácidos grasos en un tejido o fluido del ratón KO y el ratón de tipo salvaje; y

(c) comparar la cantidad de dicho uno o más compuestos o ácidos grasos en el tejido o fluido del ratón KO y el ratón de tipo salvaje, en donde cantidades mayores de dicho uno o más compuestos o ácido graso en el ratón de tipo salvaje en comparación con el ratón KO, es una indicación de transporte del compuesto o ácido graso a través de la proteína Mfsd2a, en donde el tejido o fluido es cerebro u ojo.

2. El método de la reivindicación 1, en donde:

i. la mezcla biológica se deriva de leche, extractos de aceite de pescado o formulaciones de LPC;

ii. el contacto es por *vía* oral y/o

iii. uno o más compuestos es un suplemento nutricional; opcionalmente en donde el suplemento nutricional es una formulación de LPC.

3. Un método *in vitro* para seleccionar uno o más compuestos o ácidos grasos para determinar el transporte mediado por LPC de uno o más compuestos o ácidos grasos a través de la proteína Mfsd2a, en donde el compuesto o ácido graso comprende un grupo de cabeza de ion híbrido y una cadena de acilo o alquilo, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una mezcla biológica que comprende dicho uno o más compuestos o ácidos grasos con una línea celular que comprende un ADNc Mfsd2a humano de tipo salvaje y una línea celular que comprende un ADNc Mfsd2a humano mutante o una célula simulada transfectada;

(b) medir la cantidad de dicho uno o más compuestos o ácidos grasos en células que comprenden el ADNc Mfsd2a humano de tipo salvaje y una célula que comprende ADNc Mfsd2a humano mutante o una célula simulada transfectada; y

(c) comparar la cantidad de dicho uno o más compuestos o ácidos grasos en las células que comprenden el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje y las células que comprenden Mfsd2a ADNc humano mutante o células transfectadas simuladas, en las que cantidades mayores de dicho compuesto o ácido graso en las células que comprenden Mfsd2a ADNc de tipo salvaje en comparación con las células que comprenden Mfsd2a ADNc humano mutante o células transfectadas simuladas son una indicación de transporte del compuesto o ácido graso a través de la proteína Mfsd2a.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el uno o más compuestos o ácidos grasos comprende un grupo de cabeza de fosfocolina y una longitud de cadena de acilo o alquilo de al menos 14 carbonos, opcionalmente en donde el uno o más compuestos comprenden LPC.

5. Un método *in vitro* de detección de compuestos que modulan el transporte a través de la proteína Mfsd2a que comprende:

(a) poner en contacto líneas celulares que comprenden un ADNc Mfsd2a humano de tipo salvaje o un ADNc Mfsd2a humano mutante o una célula transfectada simulada con palmitato, oleato, estearato, linoleato, linolenato, araquidonato, docosahexaenoato de de LPC o un derivado;

(b) medir la absorción del palmitato, oleato, estearato, linoleato, linolenato, araquidonato, docosahexaenoato de LPC o un derivado en presencia y ausencia de un compuesto de prueba en las células que comprenden el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje humano y las células que comprenden Mfsd2a ADNc humano mutante o células transfectadas simuladas;

en donde un aumento o disminución del nivel de absorción de palmitato de LPC, oleato, estearato, linoleato, linolinato, araquidonato, docosahexaenoato o un derivado en las células que comprenden el ADNc Mfsd2a humano de tipo salvaje en presencia del compuesto de prueba como en comparación con la ausencia de las identidades del compuesto de prueba, el compuesto como un modulador del transporte a través de la proteína Mfsd2a; opcionalmente en donde el compuesto de prueba se transporta directamente a través de la proteína Mfsd2a.

6. El método *in vitro* de la reivindicación 4 o 5, en donde:

i. la célula es HEK 293, y/o

ii. el Mfsd2a ADNc humano mutante comprende una mutación en una posición correspondiente a D93 o D97 en la secuencia de proteína Mfsd2a humana.

5 **7.** Un método *in vitro* para evaluar una mayor susceptibilidad a los déficits neurológicos en el cerebro de un sujeto que comprende:

- 10 (a) proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra comprende todo o una porción de un gen Mfsd2a; y
(b) detectar la presencia de una mutación en el gen Mfsd2a o la porción del mismo en la muestra, en donde la mutación da como resultado una sustitución Thr159Met o Ser166Leu en la proteína Mfsd2a; y
(c) evaluar que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a los déficits neurológicos en función de la presencia de la mutación en el gen Mfsd2a o la porción del mismo.

15 **8.** El método *in vitro* de la reivindicación 7, en donde:

- 20 i. el déficit neurológico es un déficit en memoria y aprendizaje o ansiedad;
ii) el sujeto es una mujer antes de la concepción o durante el embarazo; opcionalmente en donde a la mujer se le ha administrado una dieta alta en DHA o tratamiento i.v. o enteral con LPC, si la mutación en el gen Mfsd2a o la porción del mismo está presente; opcionalmente en donde el LPC comprende LPC-DHA;
25 iii) el sujeto es un niño o adulto diagnosticado con problemas con la función cognitiva; opcionalmente en donde la función cognitiva es una discapacidad de aprendizaje o ansiedad; opcionalmente en donde se ha administrado al niño o adulto una dieta alta en DHA o tratamiento i.v. o enteral con LPC, si la mutación en el gen Mfsd2a o la porción del mismo está presente; opcionalmente en donde el LPC comprende LPC-DHA;
iv. la detección comprende poner en contacto la muestra con una sonda de oligonucleótidos que hibrida preferentemente con el gen Mfsd2a o la porción del mismo;
v. la detección comprende amplificar por PCR el gen Mfsd2a o la porción del mismo; y/o
vi. la detección comprende secuenciar el gen Mfsd2a, la porción del mismo, o el Mfsd2a ADNc correspondiente o una porción del mismo.

30 **9.** Un método *in vitro* para evaluar la función de transporte de una proteína Mfsd2a de un sujeto que comprende:

- 35 (a) expresar un Mfsd2a ADNc de prueba en una primera célula y un Mfsd2a ADNc de tipo salvaje en una segunda célula;
(b) poner en contacto la primera célula que expresa el Mfsd2a ADNc de prueba y la segunda célula que expresa el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje con ácidos grasos LPC-DHA o LPC-omega 3; y
(c) medir la absorción de ácidos grasos LPC-DHA o LPC-omega 3 en la primera célula que expresa el Mfsd2a ADNc de prueba y la segunda célula que expresa el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje,

40 en donde un nivel disminuido de absorción de ácidos grasos LPC-DHA o LPC-omega 3 en la primera célula que expresa el Mfsd2a ADNc de prueba en comparación con la segunda célula que expresa el Mfsd2a ADNc de tipo salvaje indica que el Mfsd2a ADNc de prueba codifica una proteína deficiente para el transporte.

10. El método *in vitro* de la reivindicación 9, en donde:

- 45 i. el ADNc de prueba Mfsd2a codifica una mutación Thr159Met o Ser166Leu; y/o
ii. la prueba de Mfsd2a ADNc codifica uno o más de los polimorfismos enumerados en las tablas 4, 7 u 8.

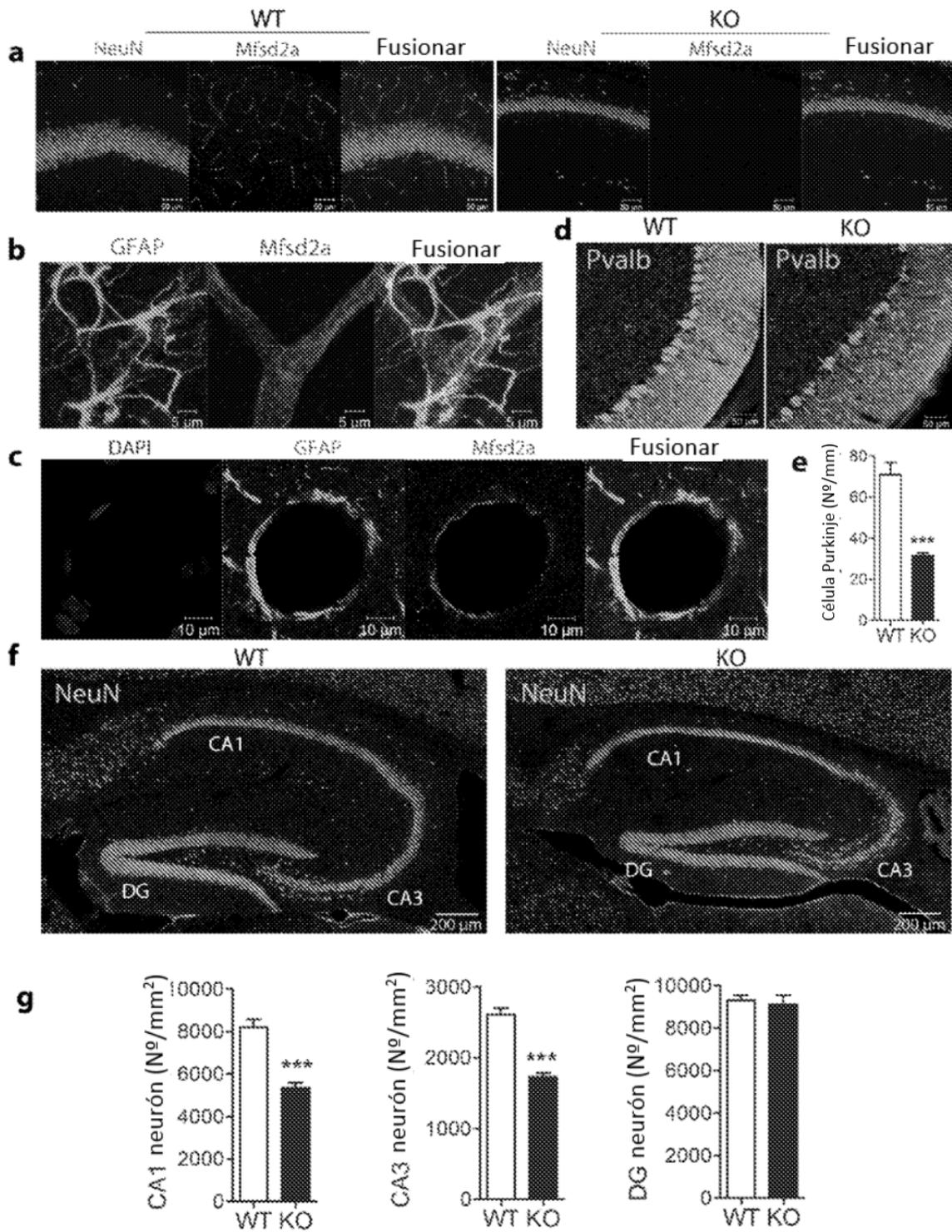


Fig. 1

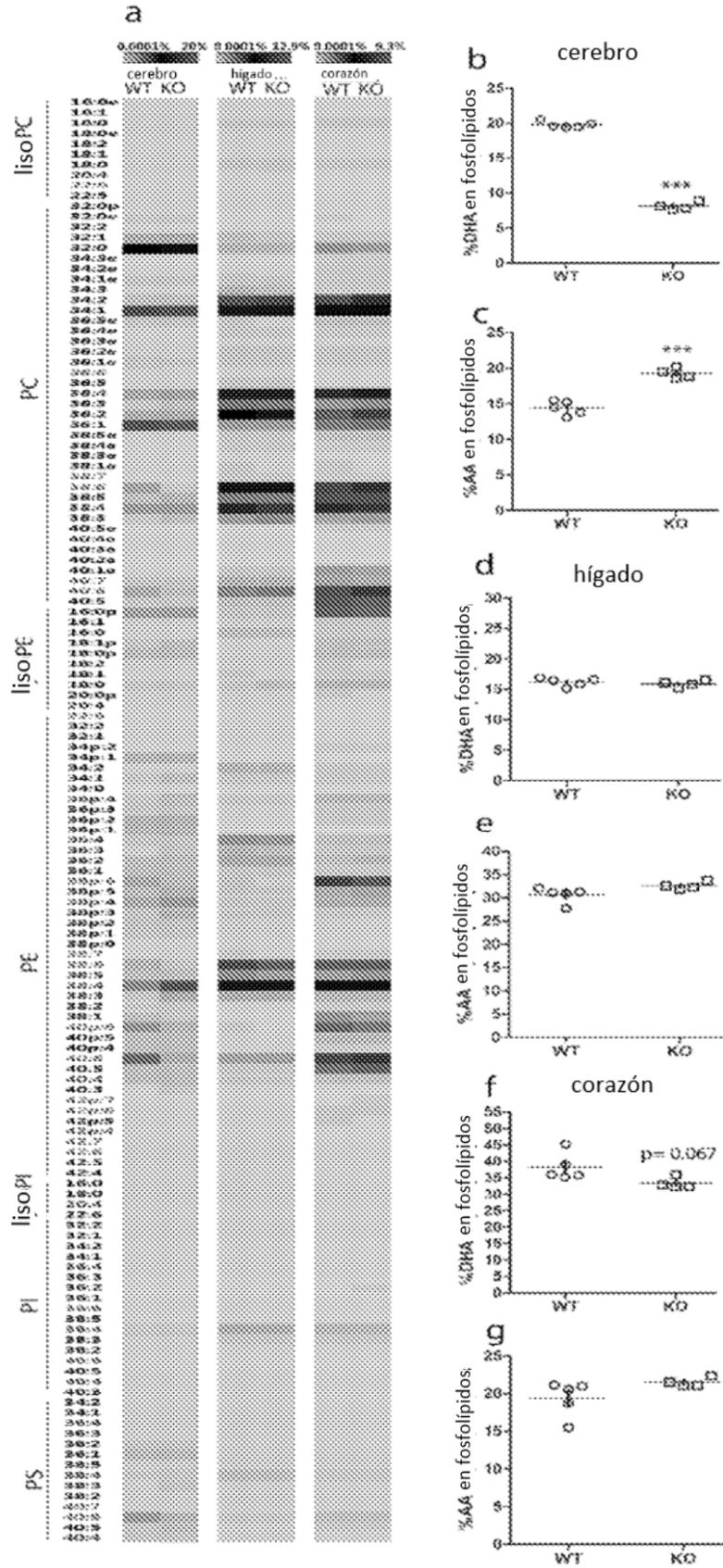


Fig. 2

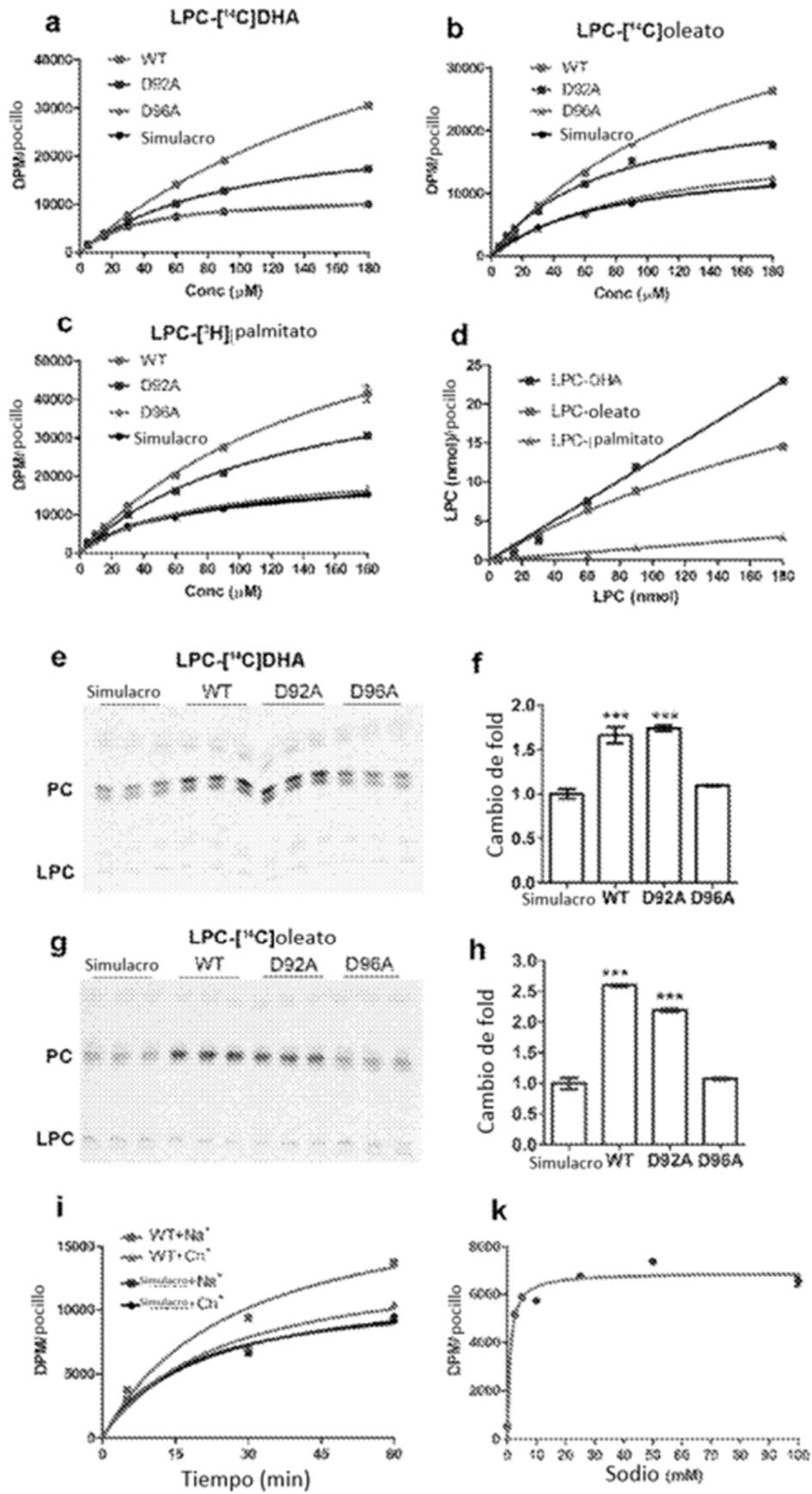


Fig. 3

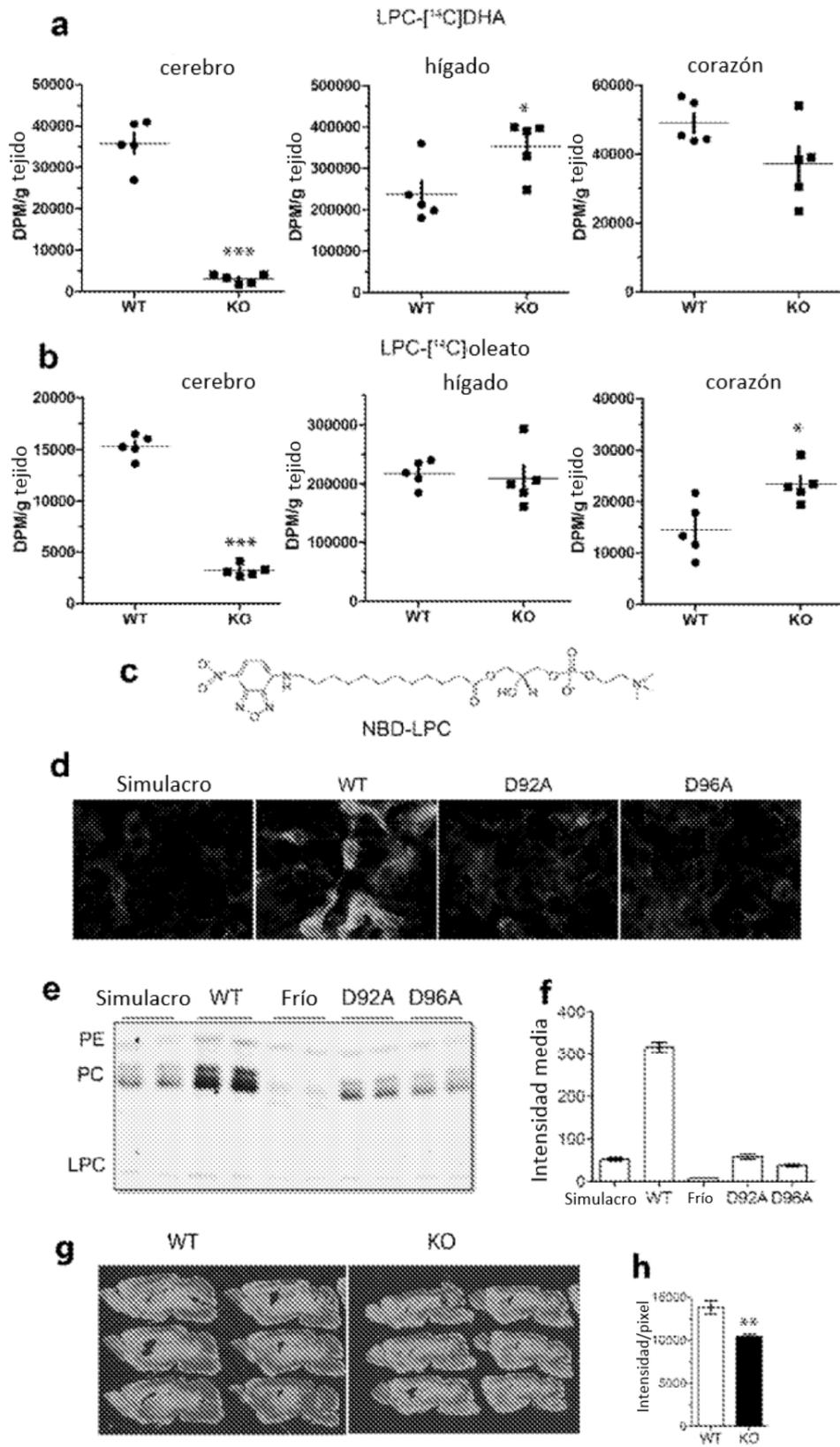


Fig. 4

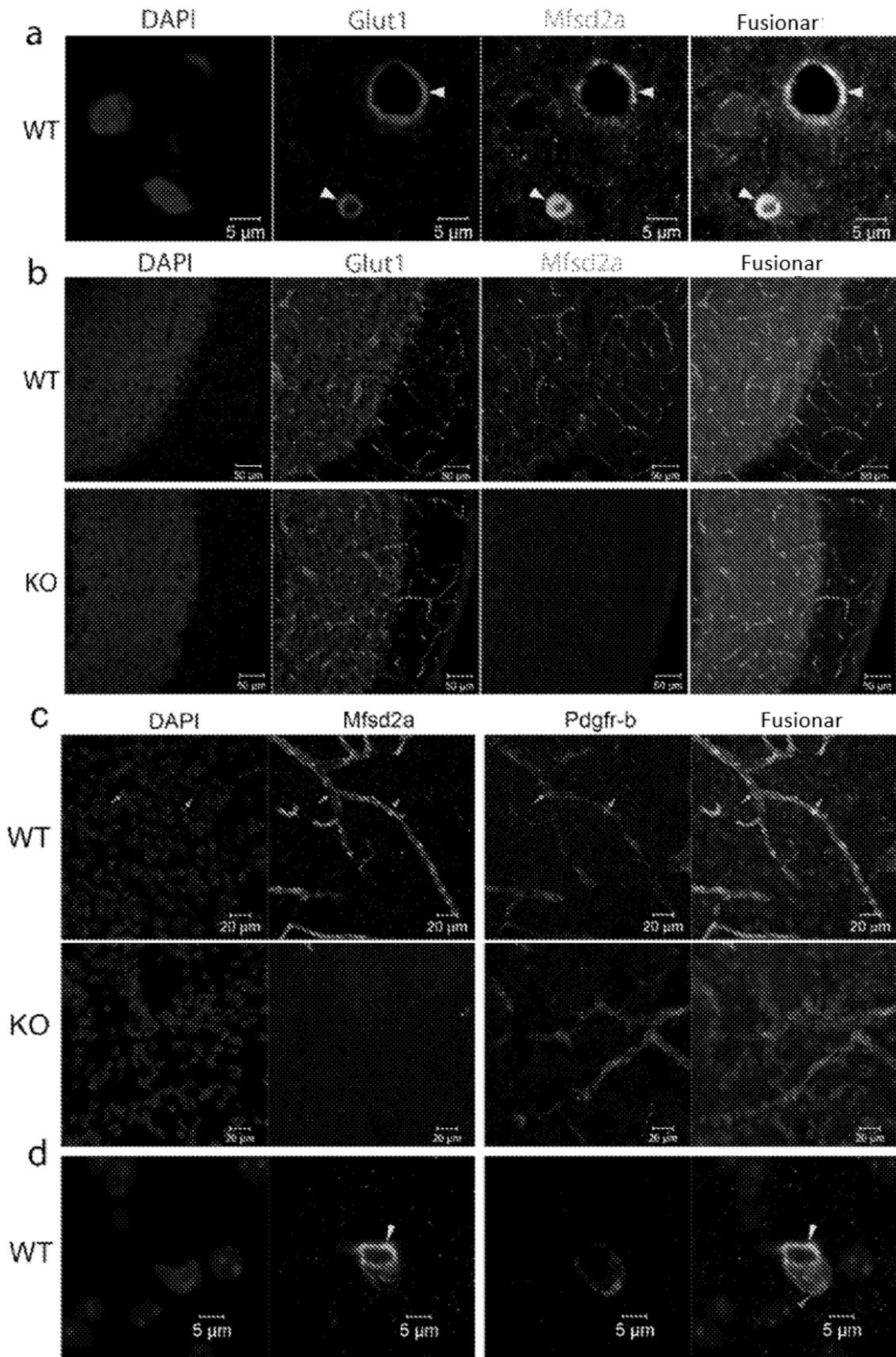


Fig. 5

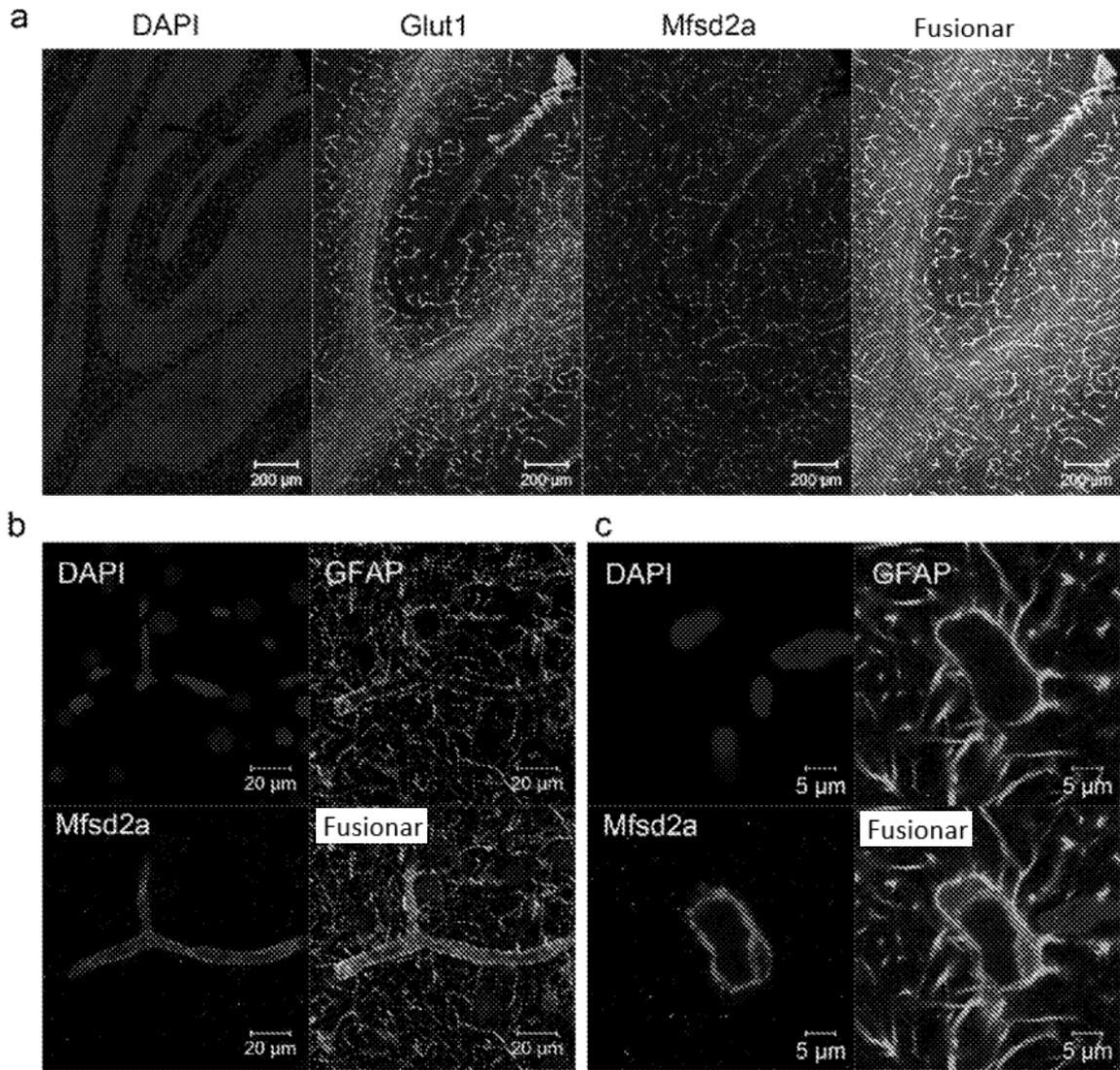


Fig. 6

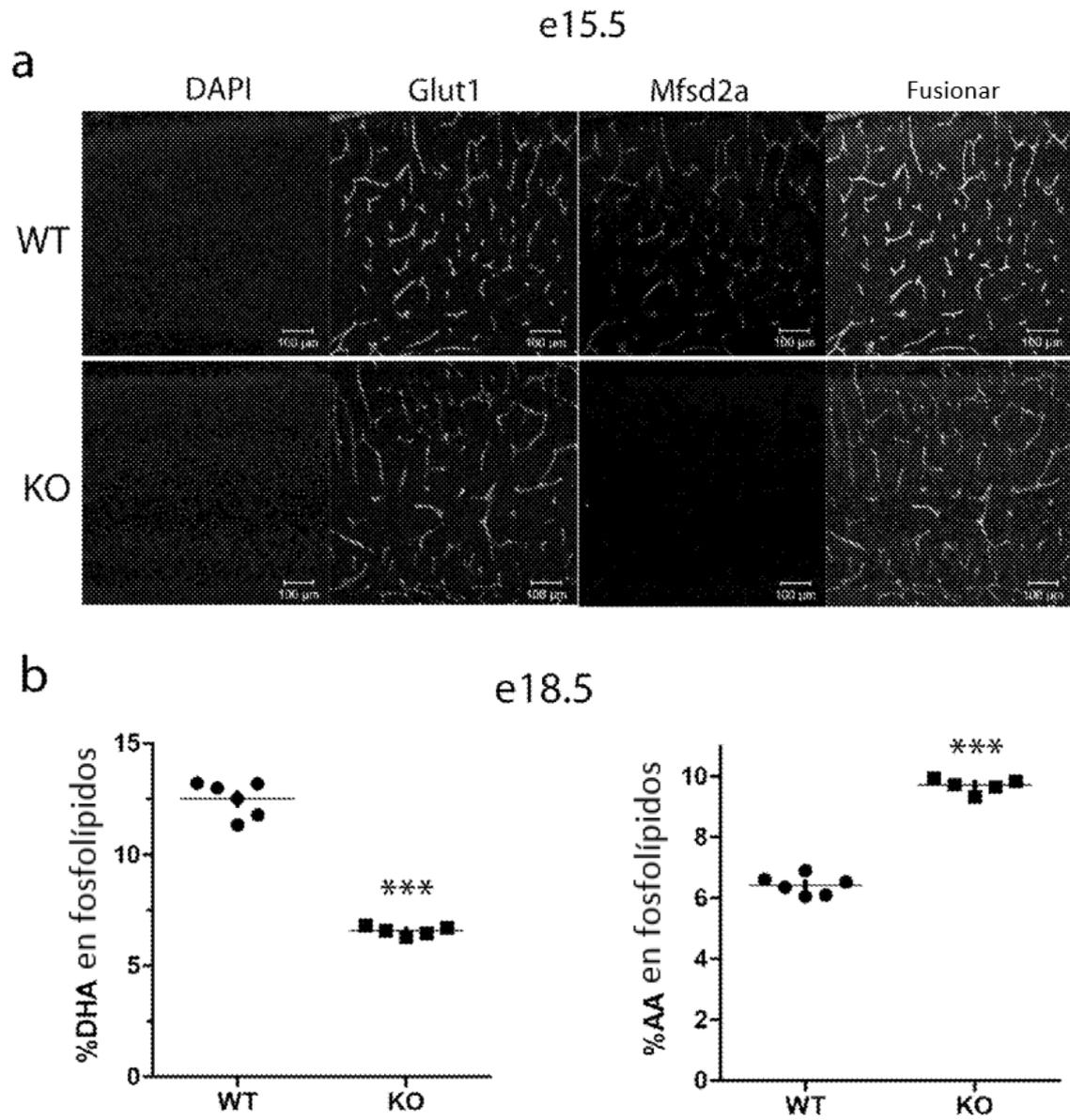


Fig. 7

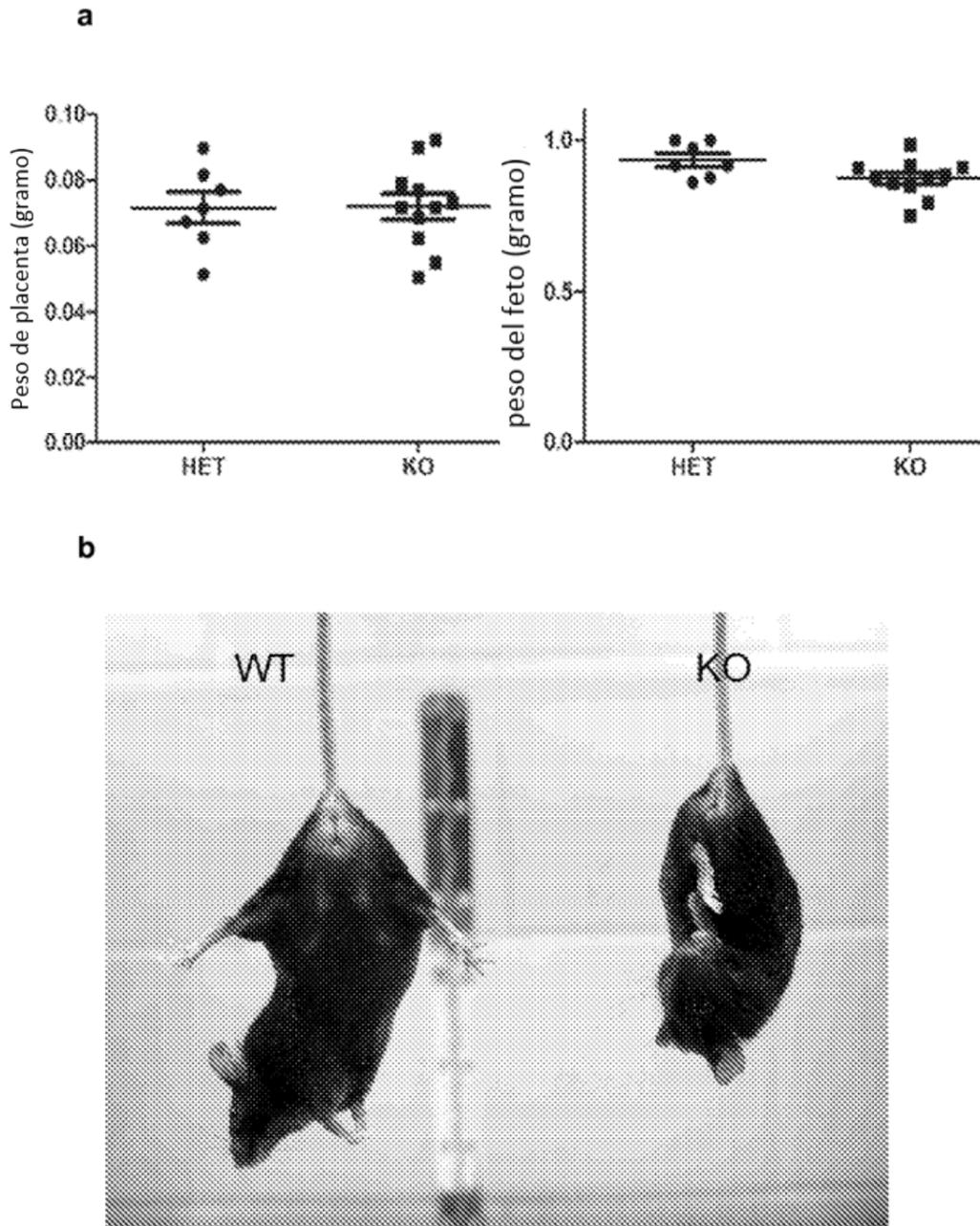


Fig. 8

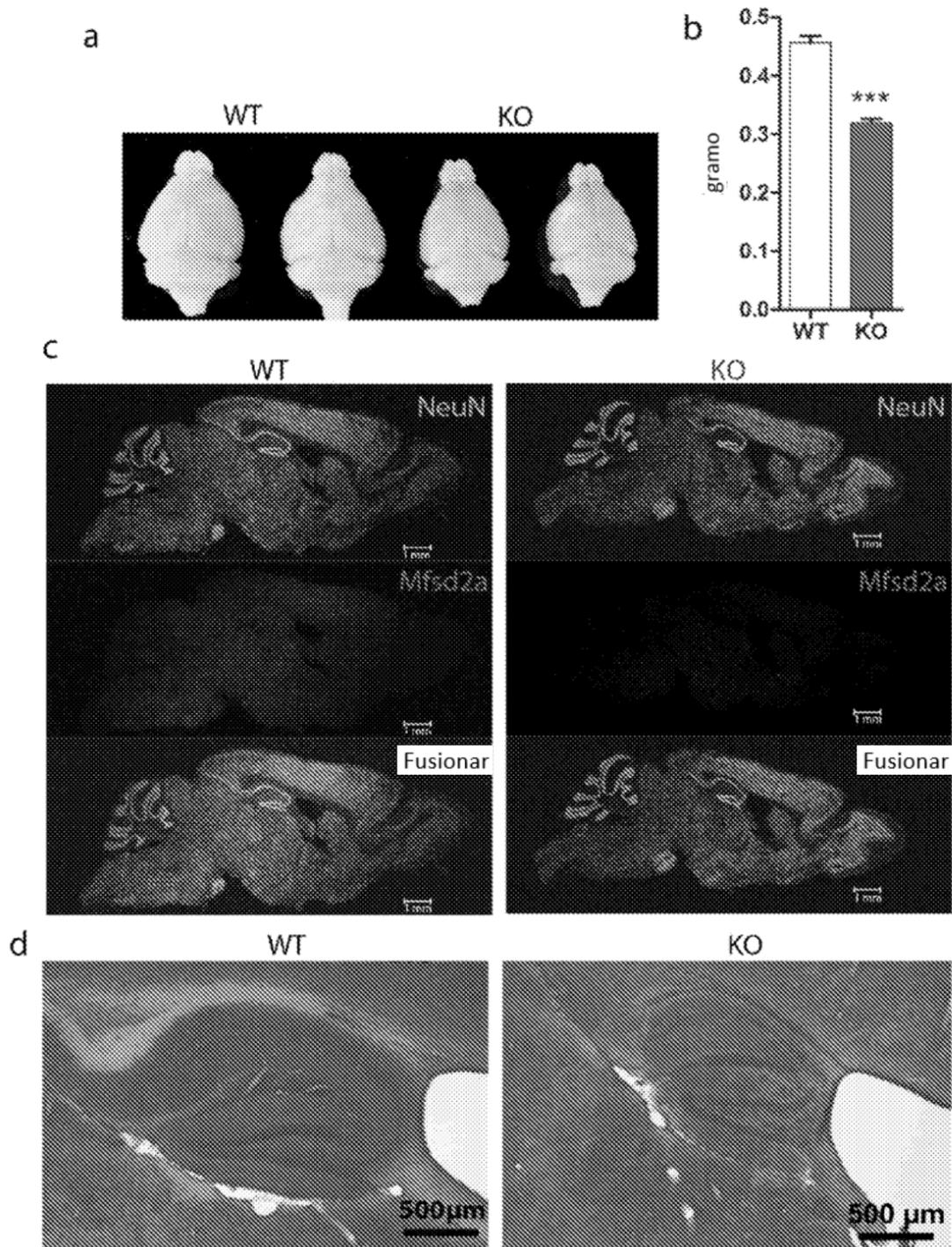


Fig. 9

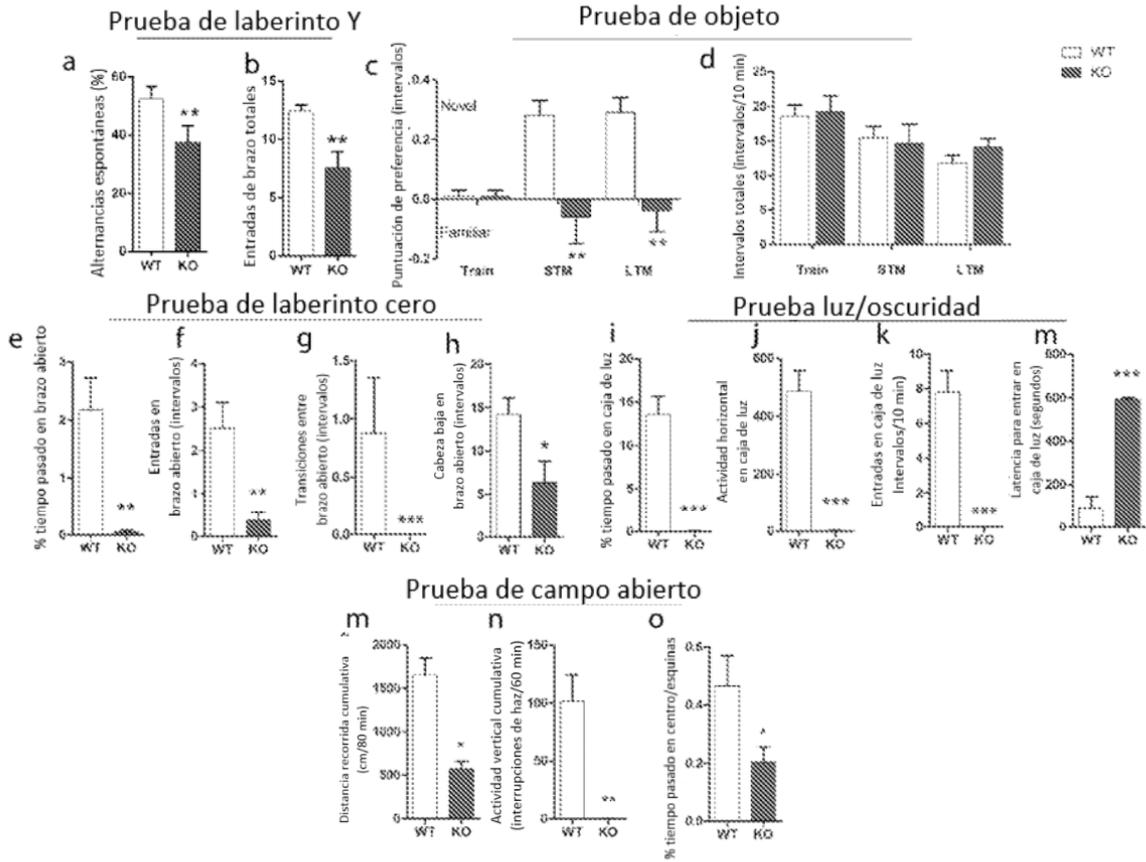


Fig. 10

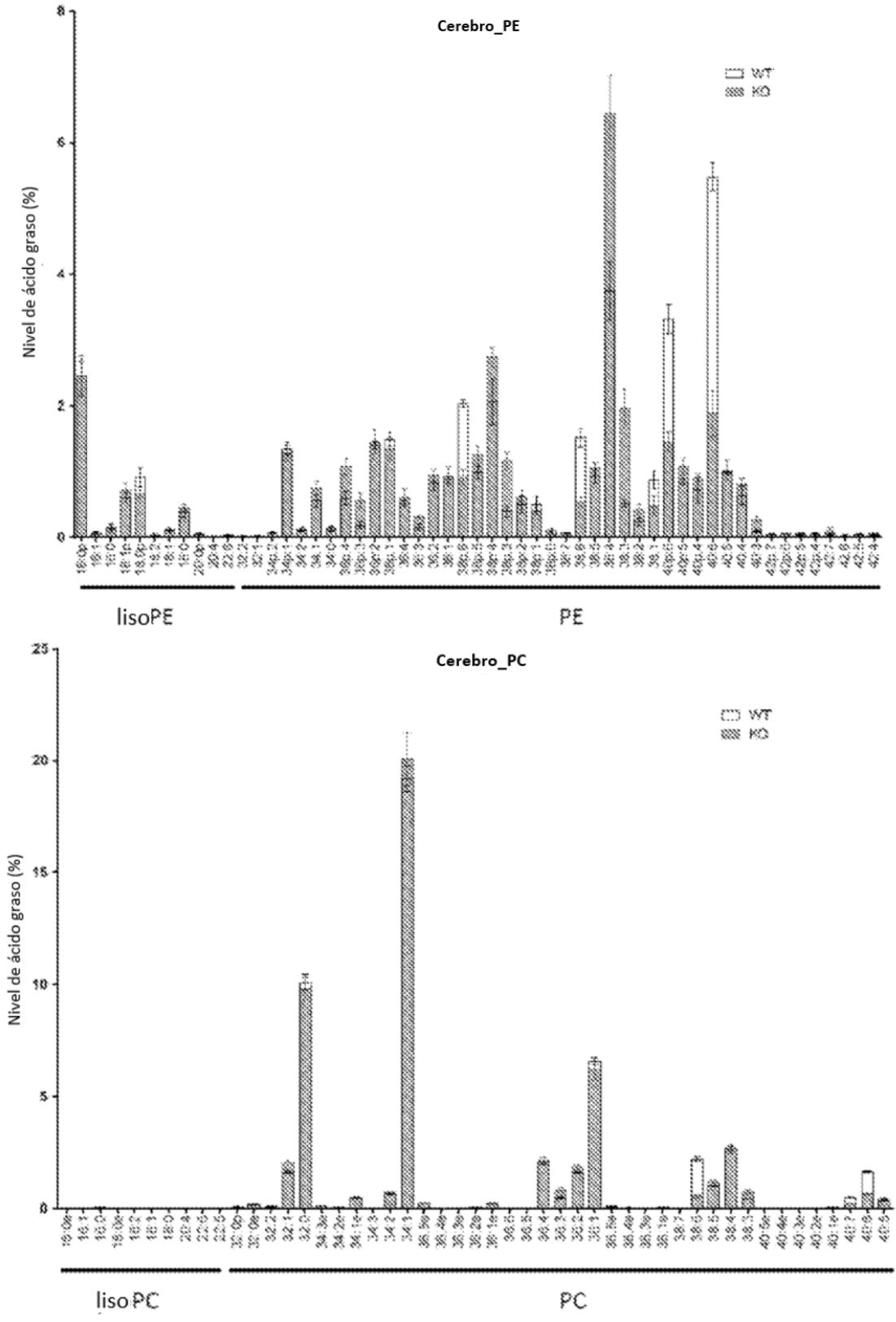


Fig. 11a

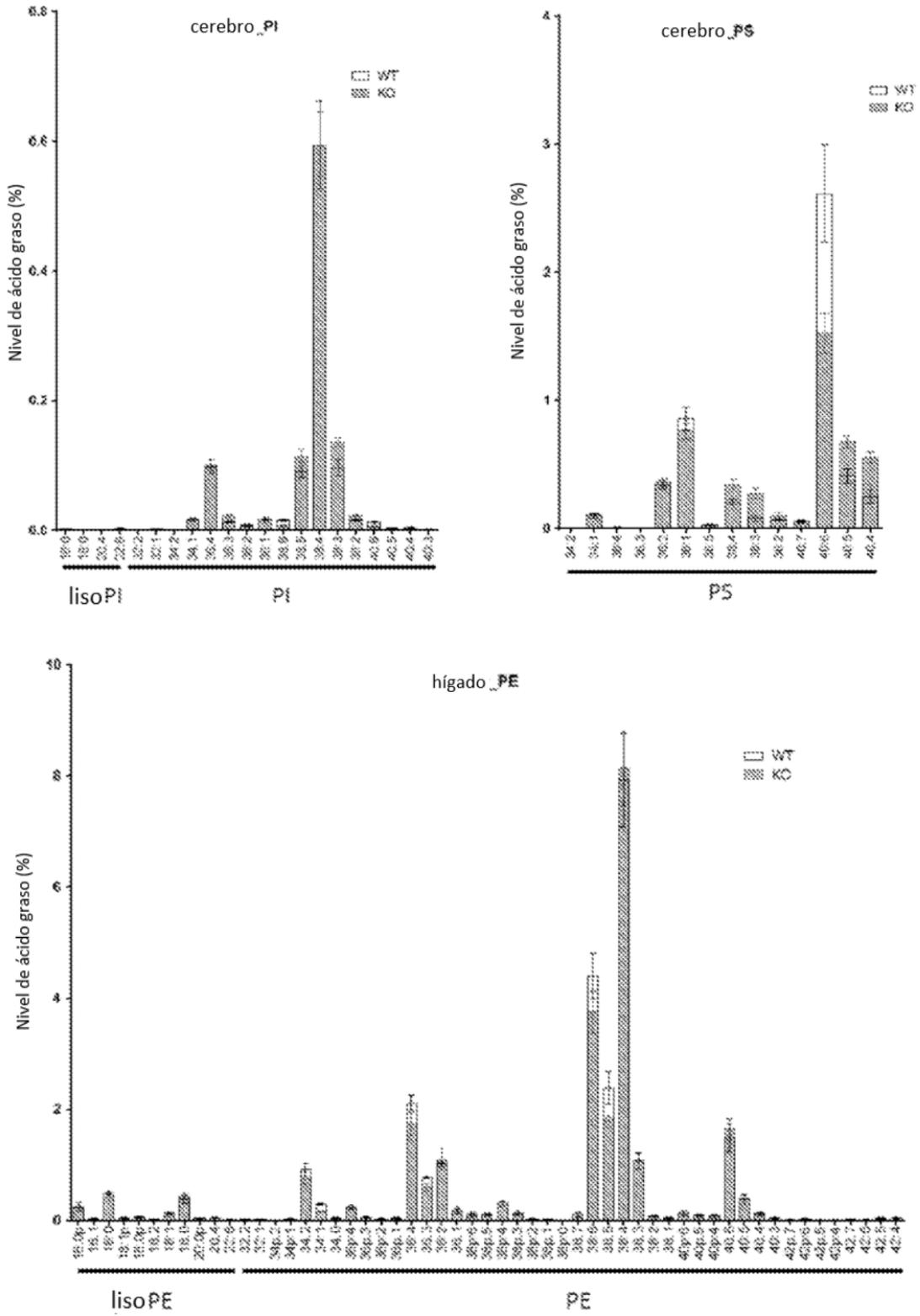


Fig. 11b

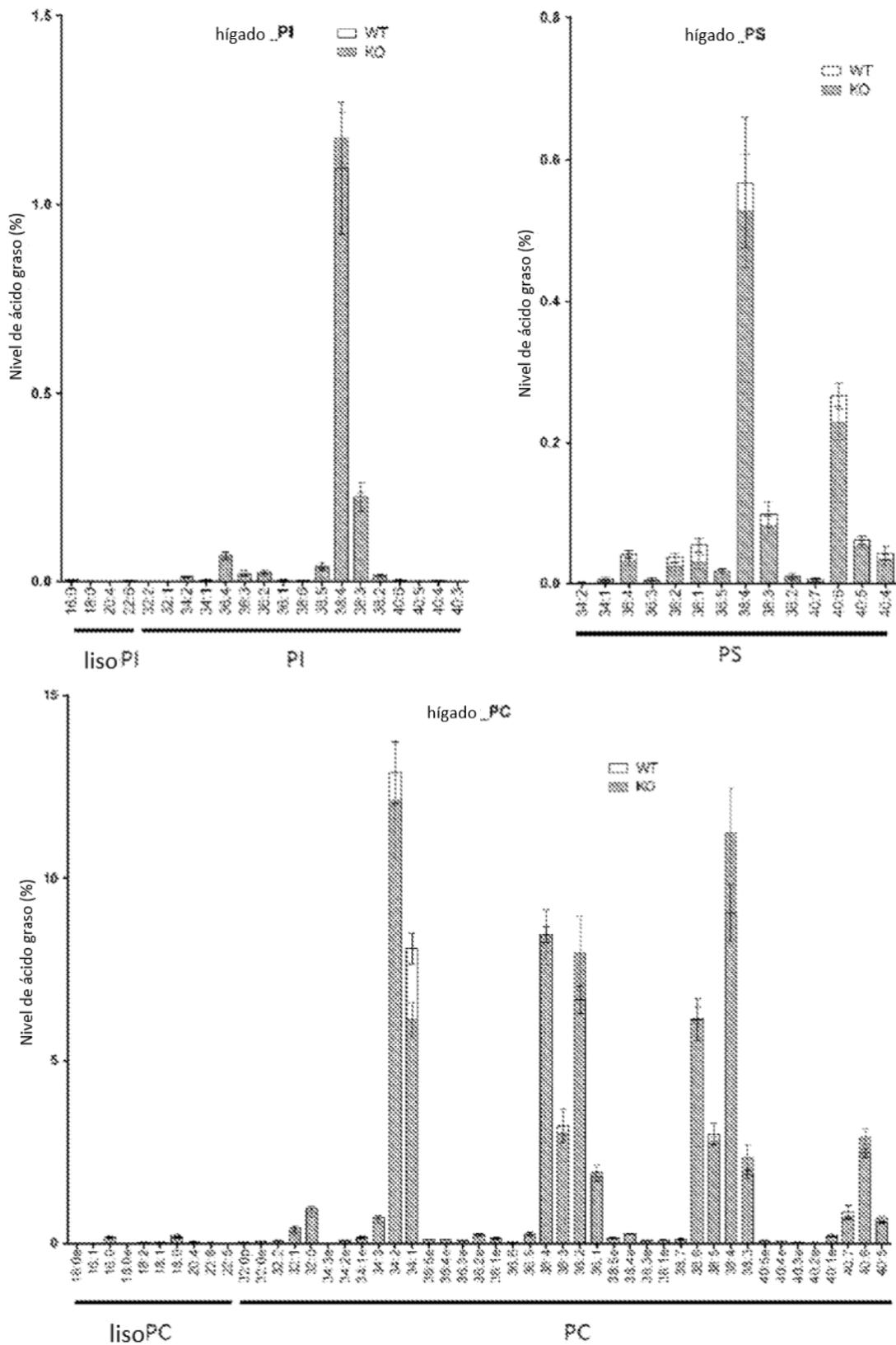


Fig. 11c

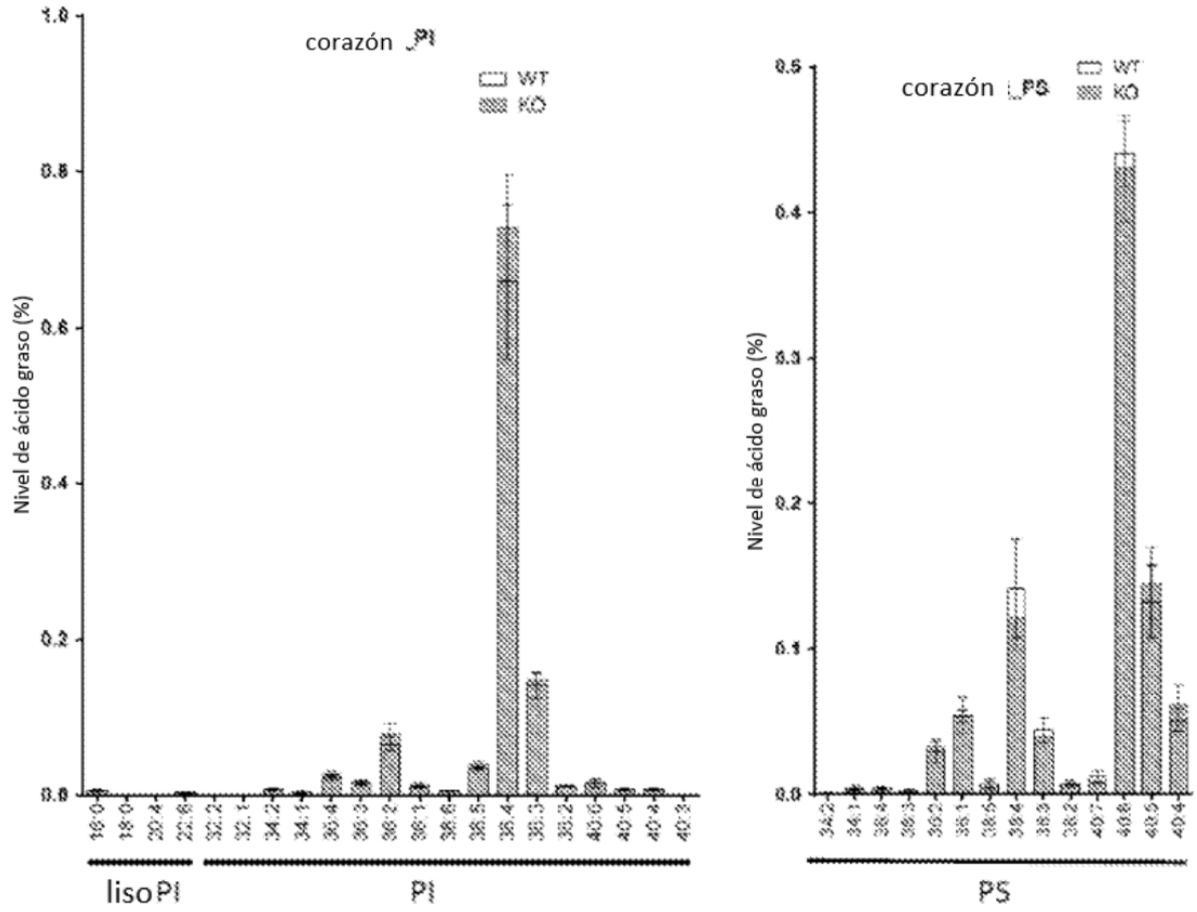


Fig. 11e

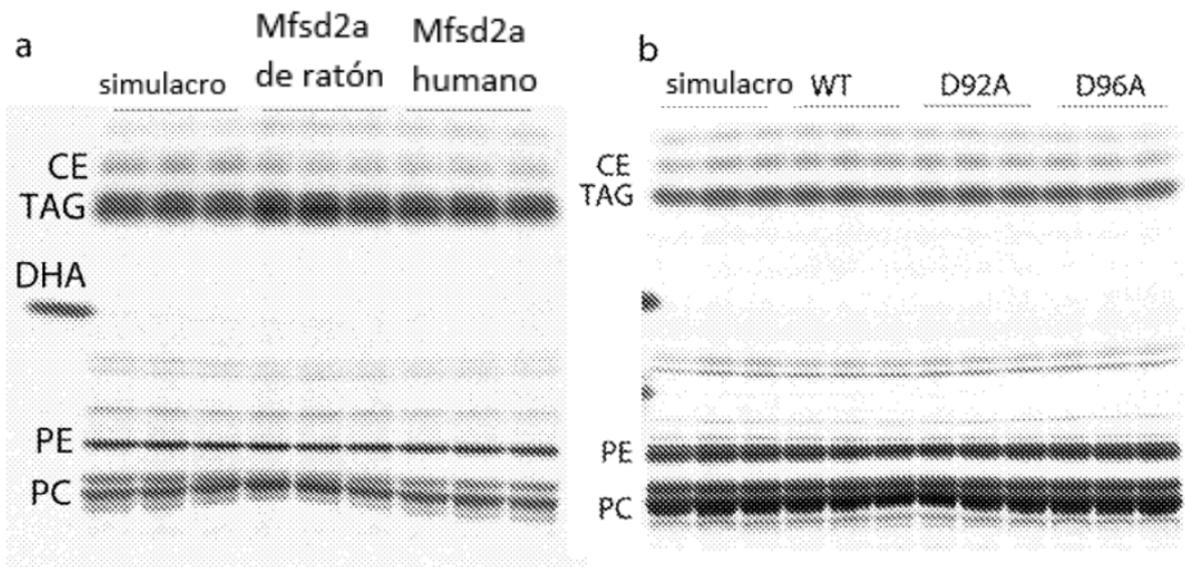


Fig. 12

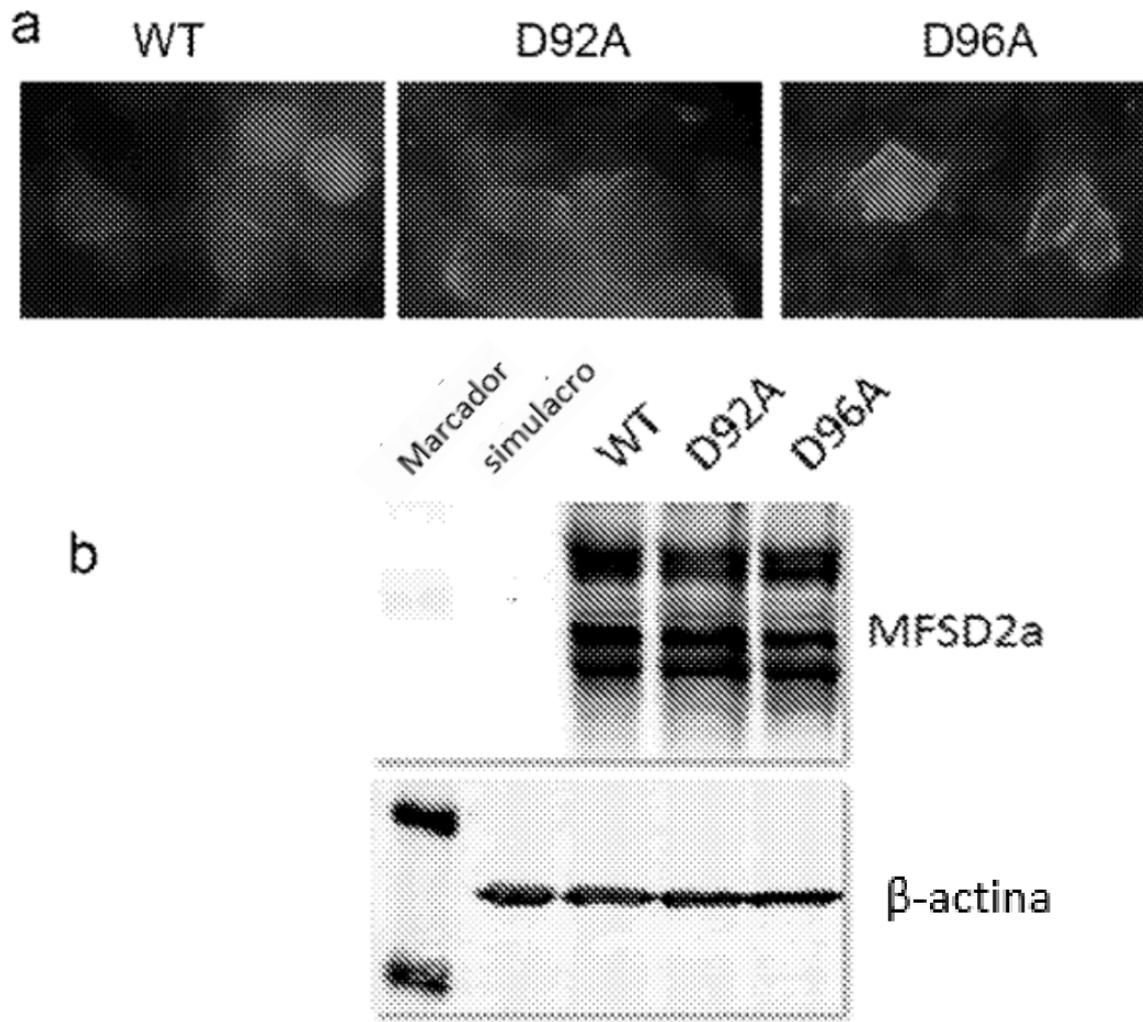


Fig. 13

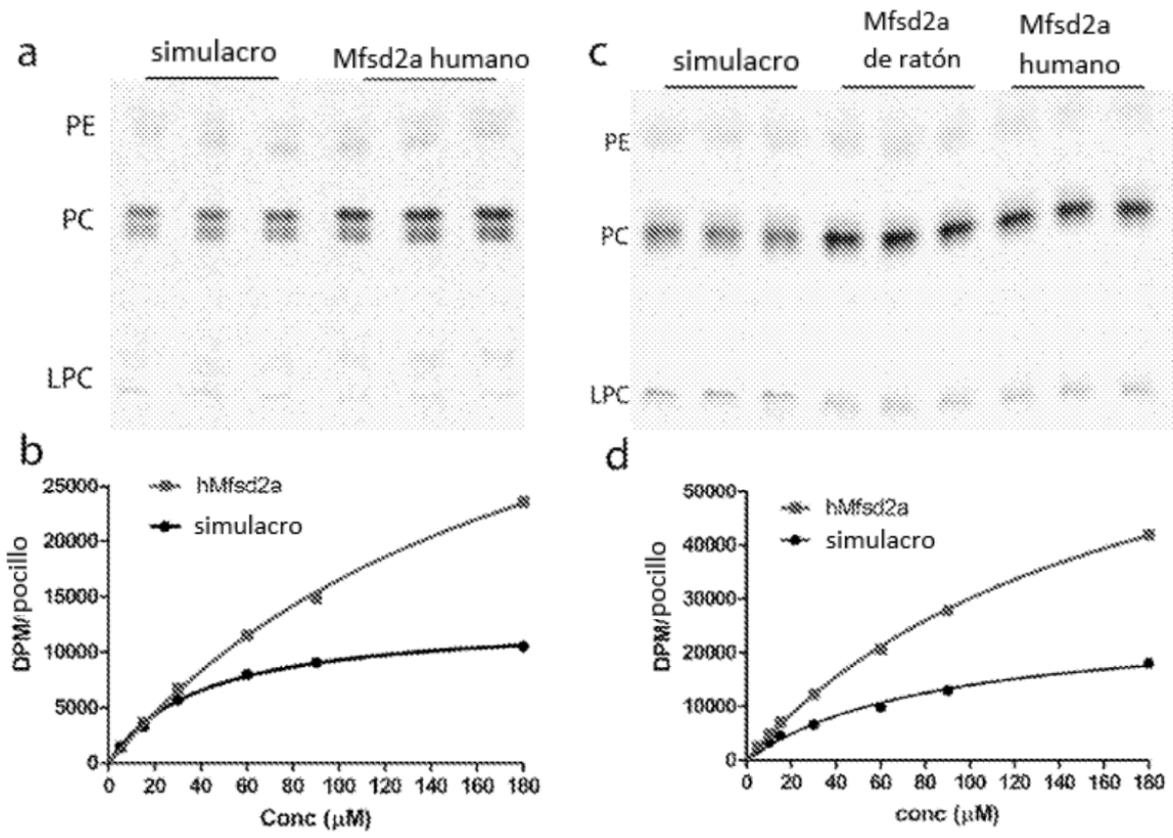


Fig. 14

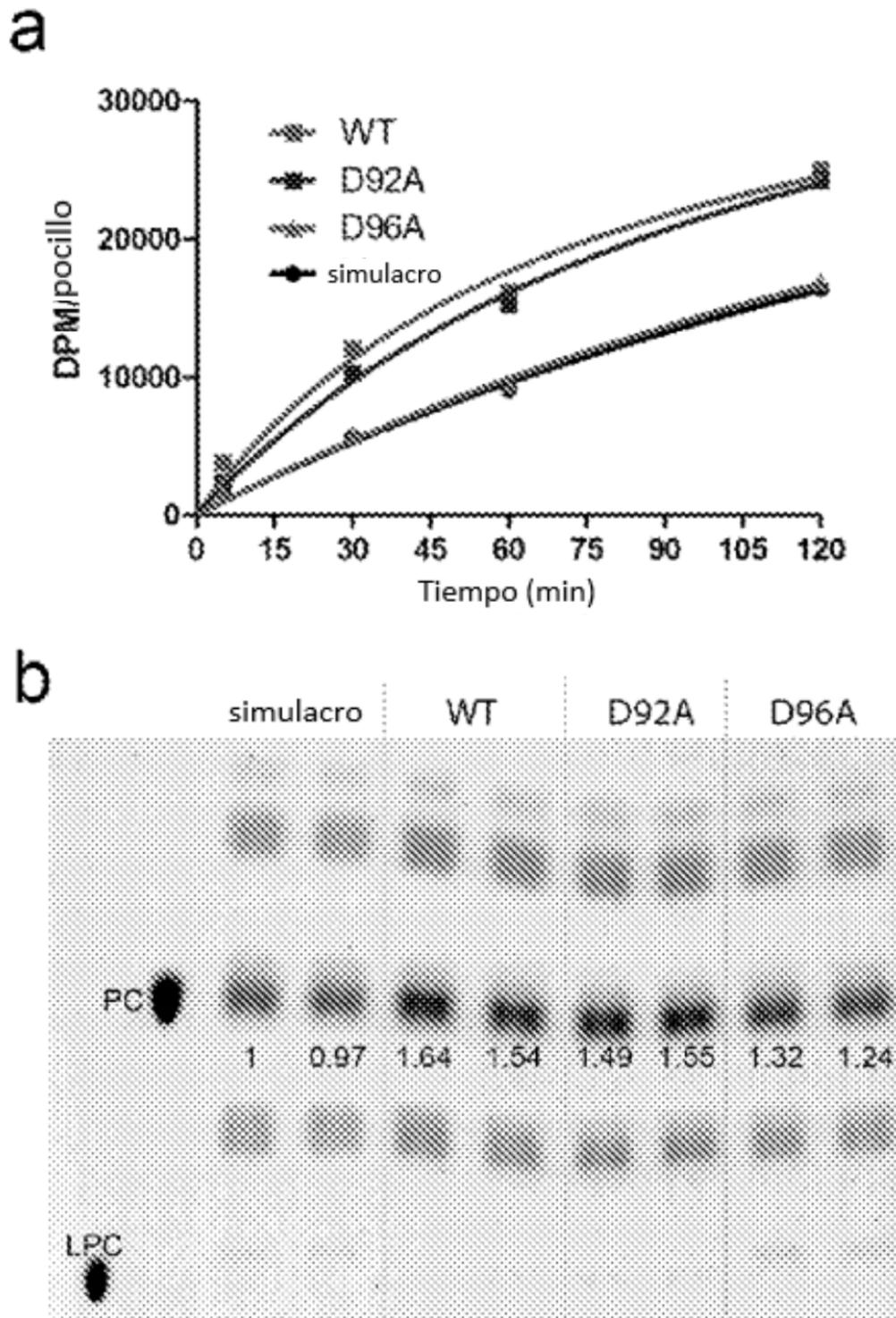


Fig. 15

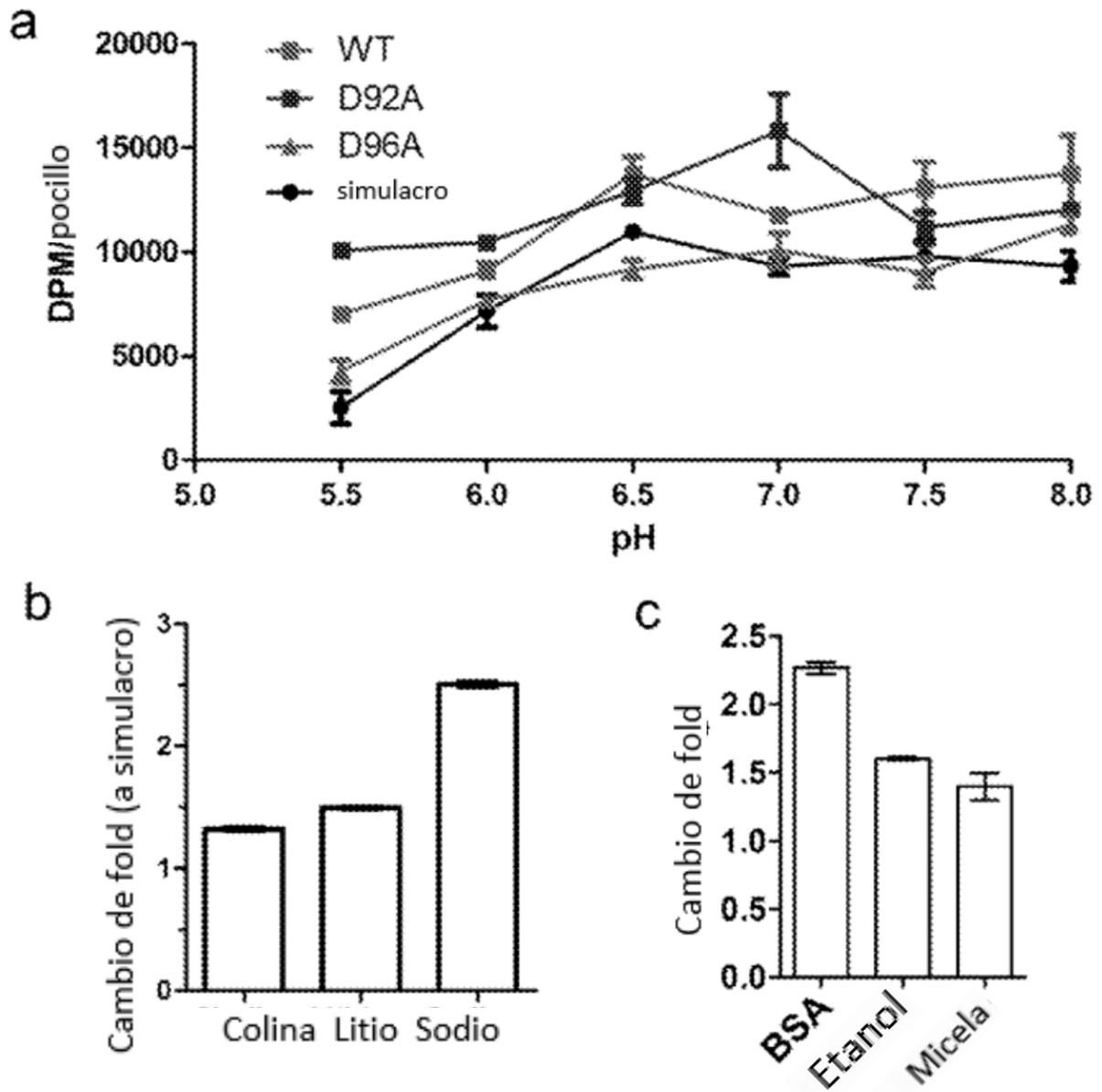


Fig. 16

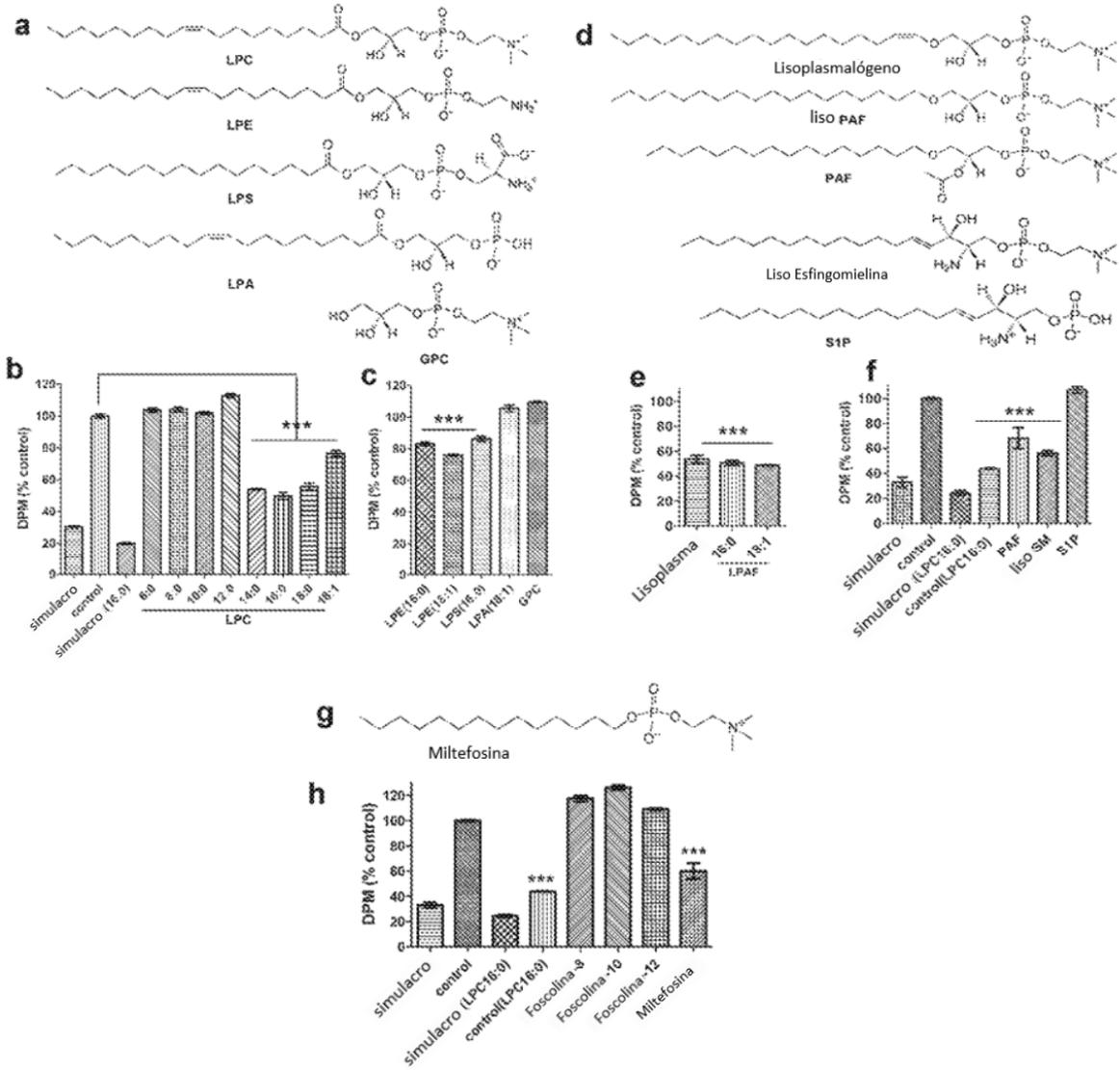


Fig. 17

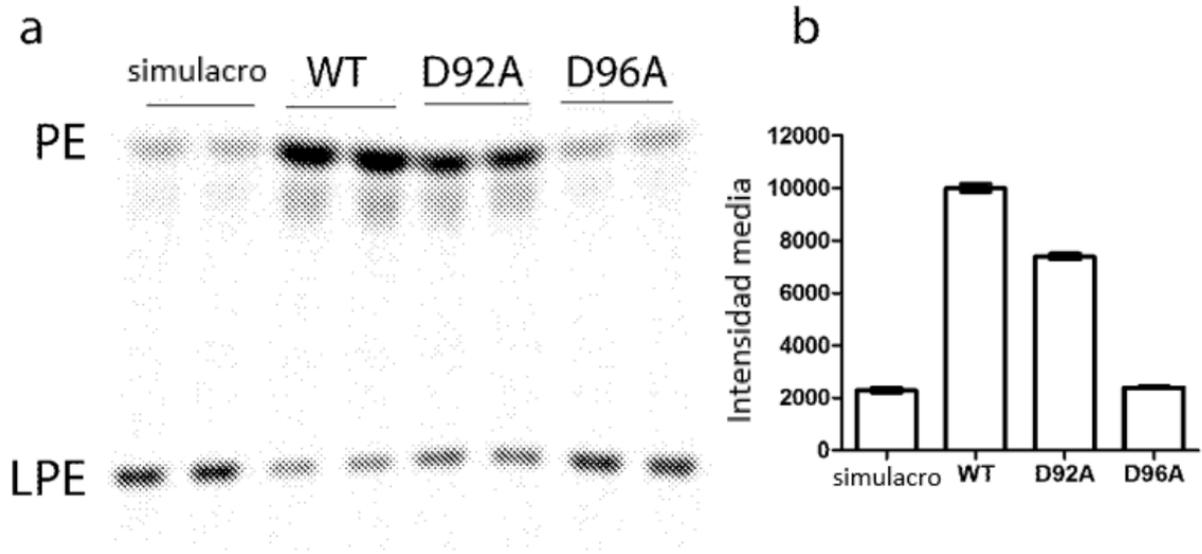


Fig. 18

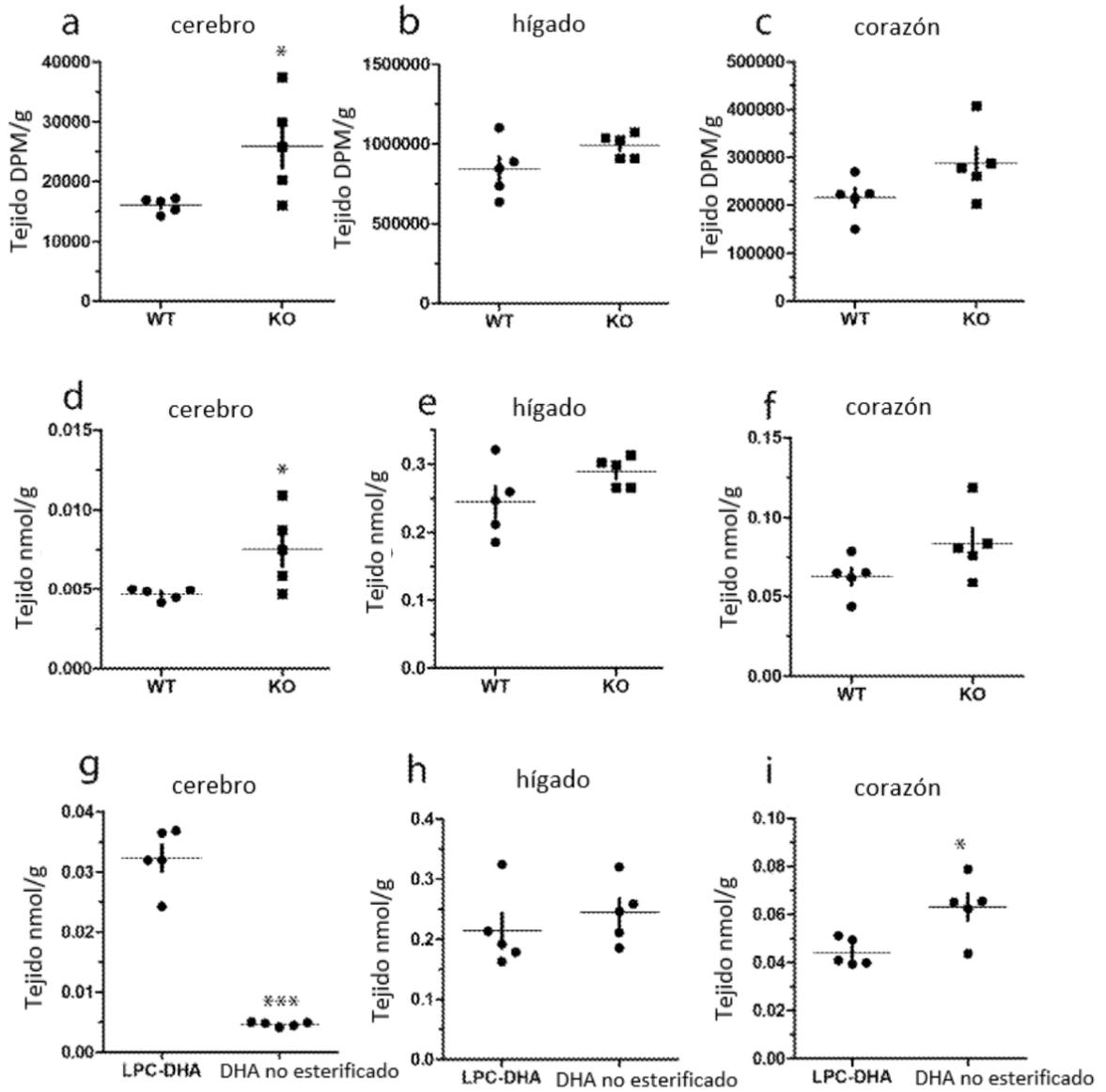


Fig. 19

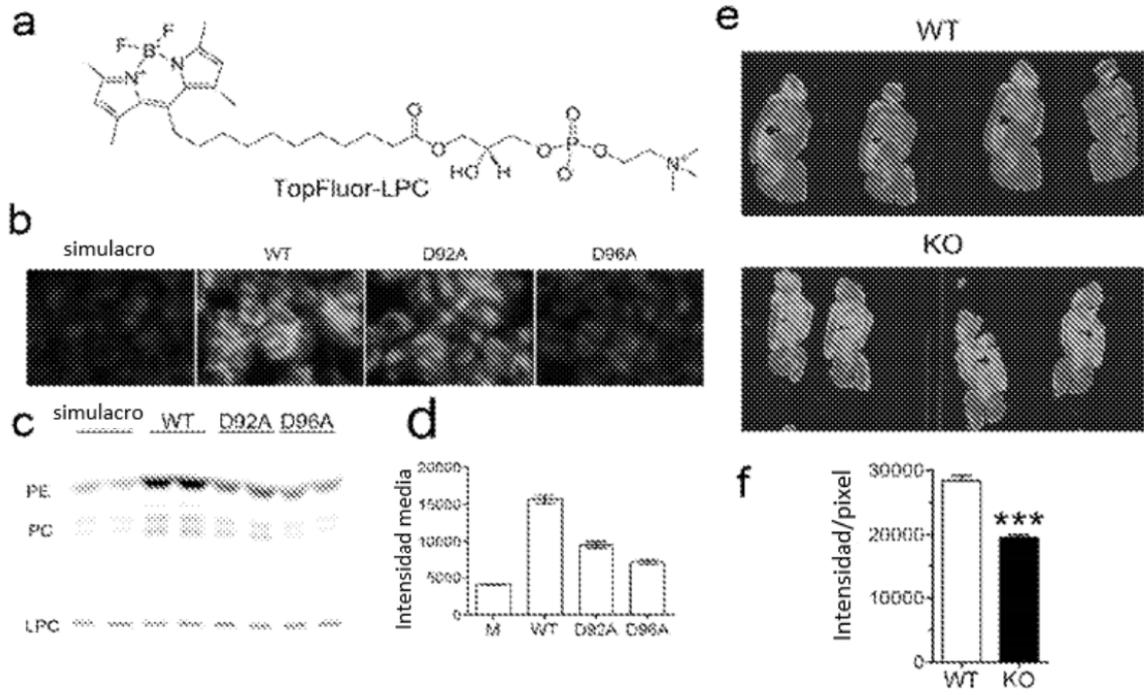


Fig. 20

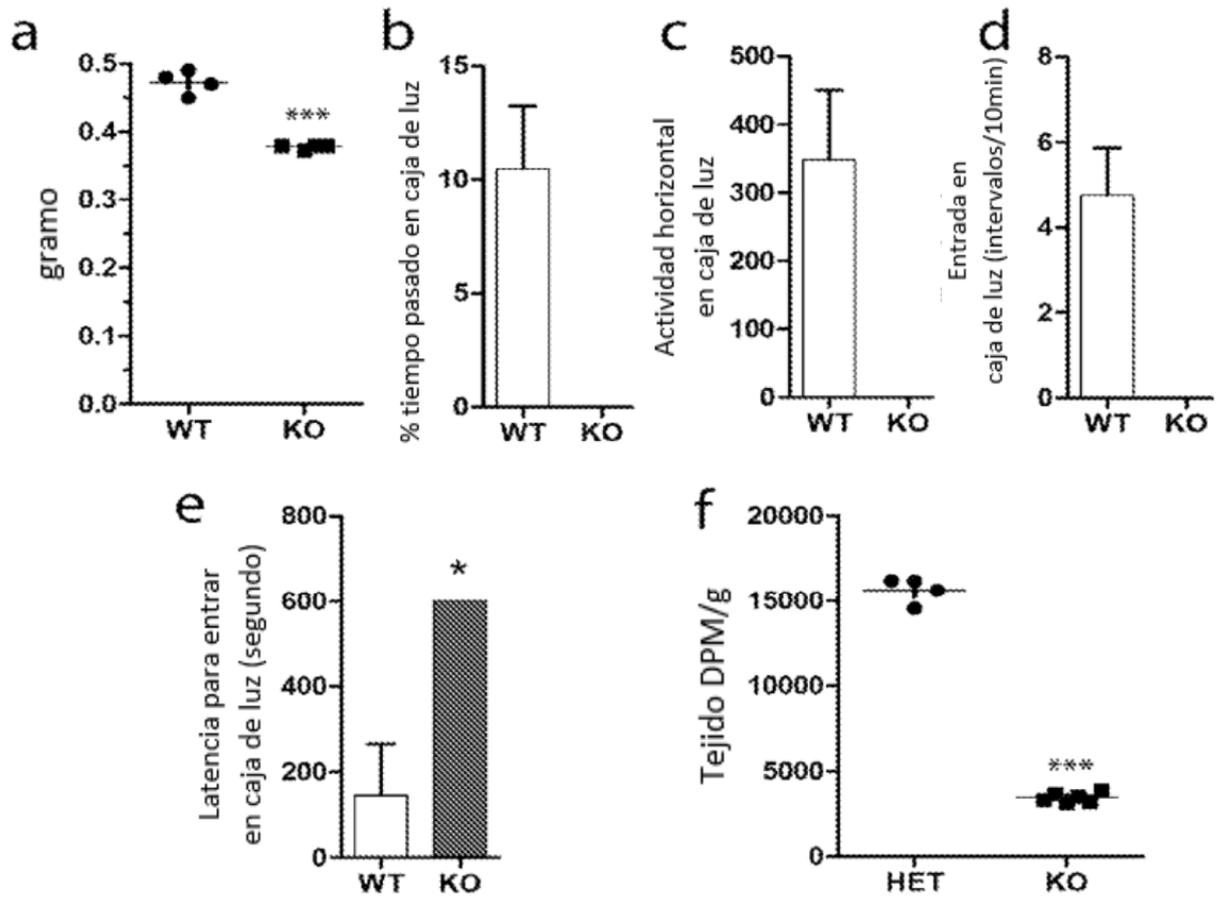
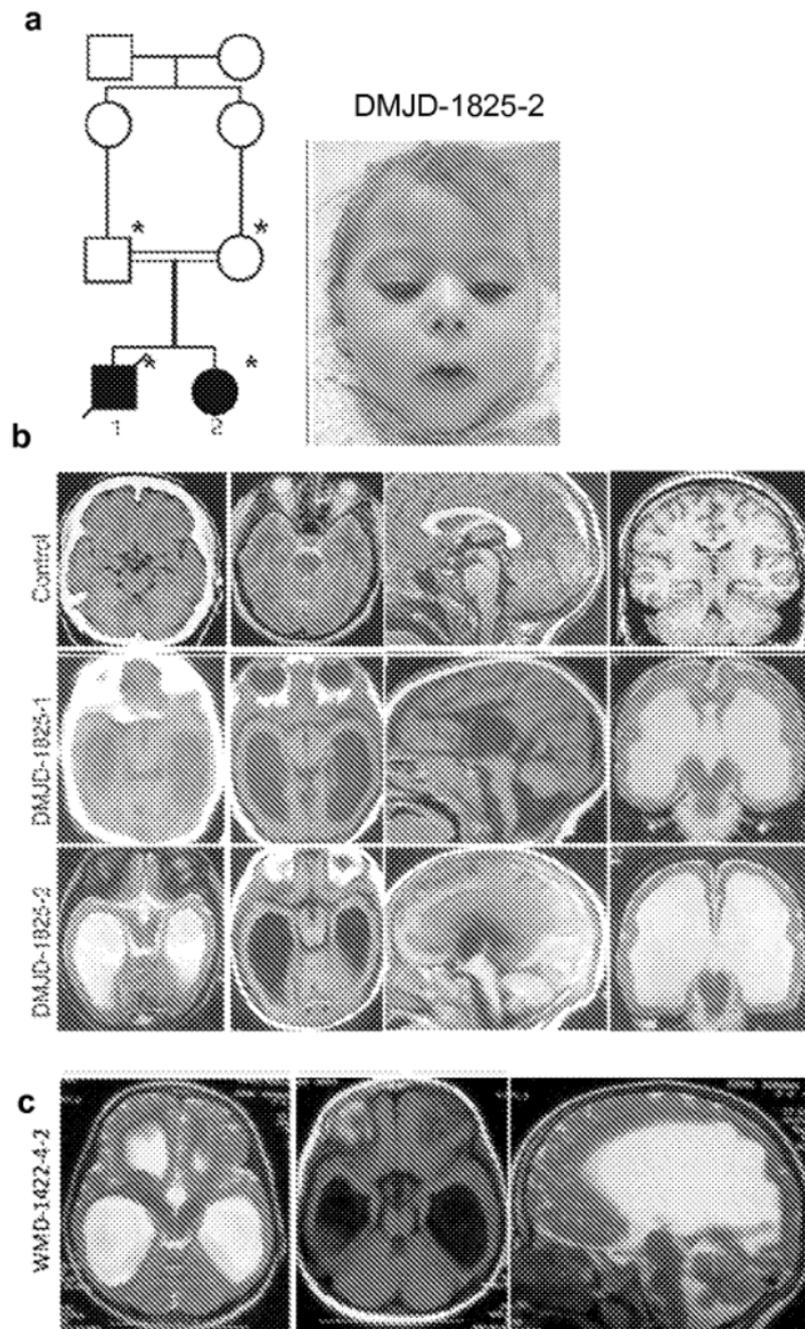


Fig. 21



Humanos con mutaciones homocigóticas *Mfsd2a* exhiben microcefalia severa. *a*, un pedigrí de una familia consanguínea egipcia para la mutación Thr159Met. Objetos negros en el pedigrí indican niños afectados. El imagen a la derecha del pedigrí es de la niña afectada mostrada como nº2 en el pedigrí. *b*, imágenes estructurales cerebrales utilizando el IRM mostrando microcefalia severa e hidrocefalia en niños afectados. Nota la pequeña corteza y falta de pliegues en el cerebro. Estos datos son de Zaki M S et al. *Brain* 2012;135:2416-2427, en los que se puede encontrar otros datos clínicos. *c*, Imagen IRM del cerebro de un niño no emparentado de una familia libia que tiene una mutación Ser166Leu homocigótica. Nota la similitud en fenotipo entre estos dos pacientes no emparentados.

Fig. 22

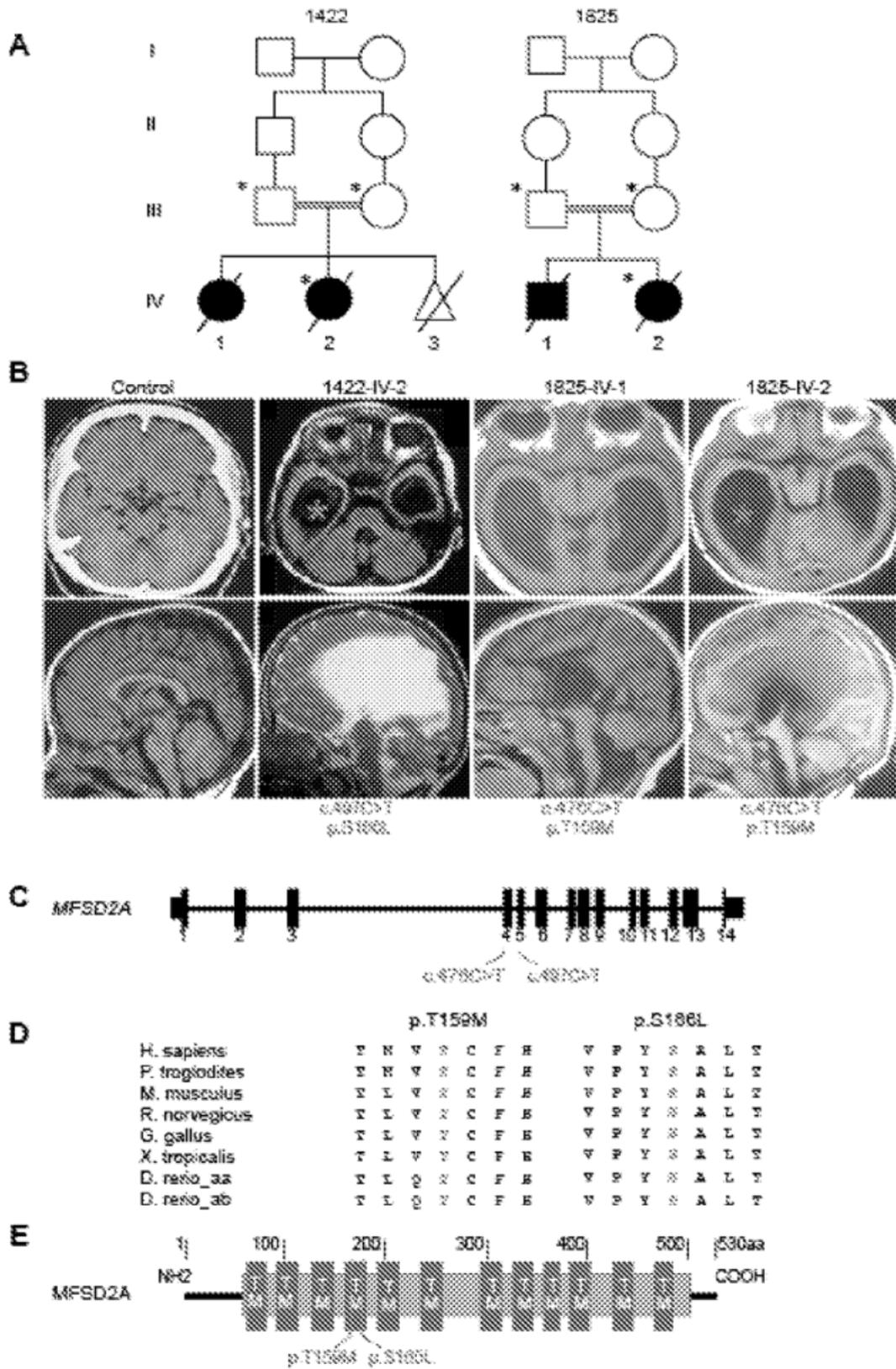


Fig. 23

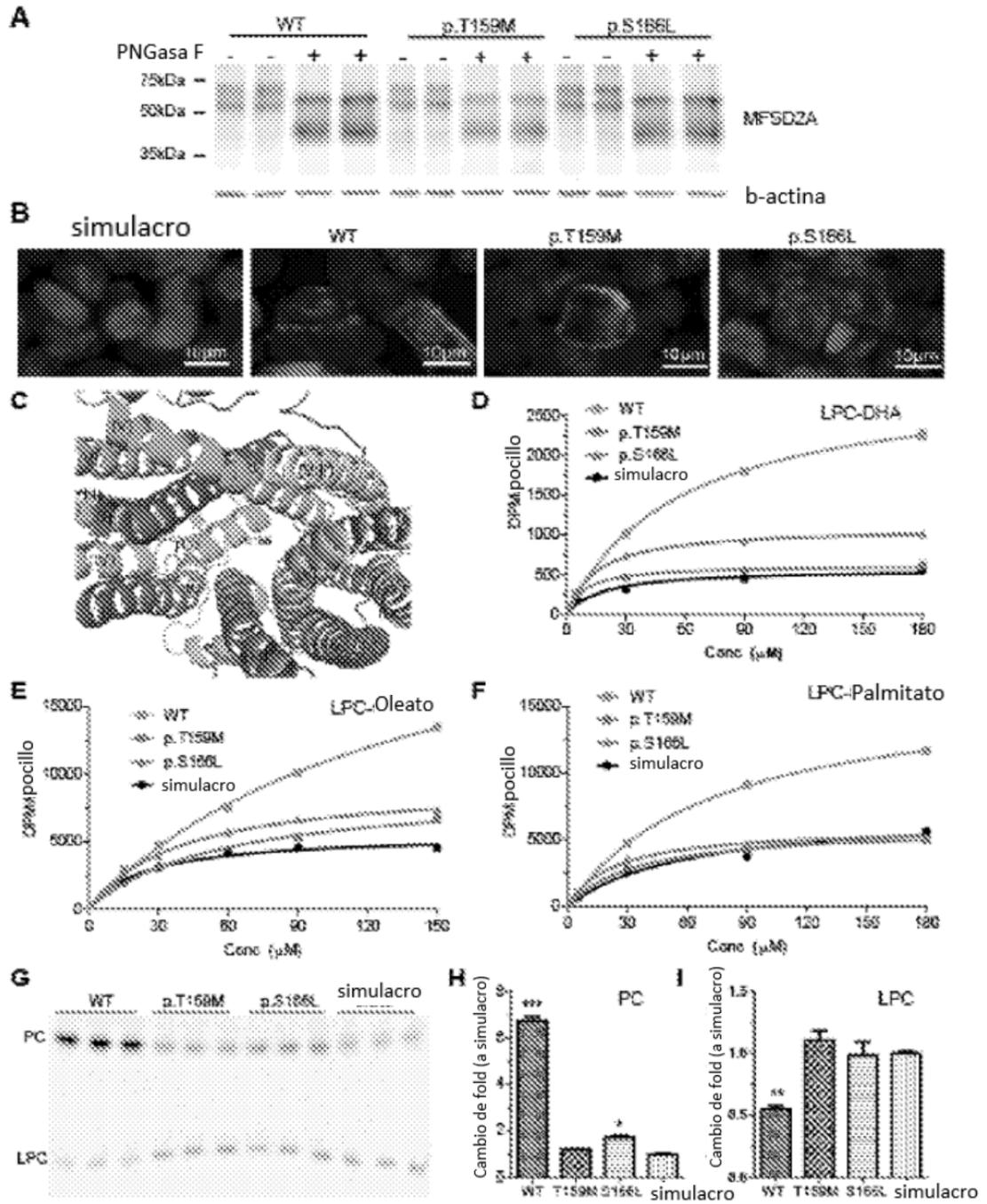


Fig. 24

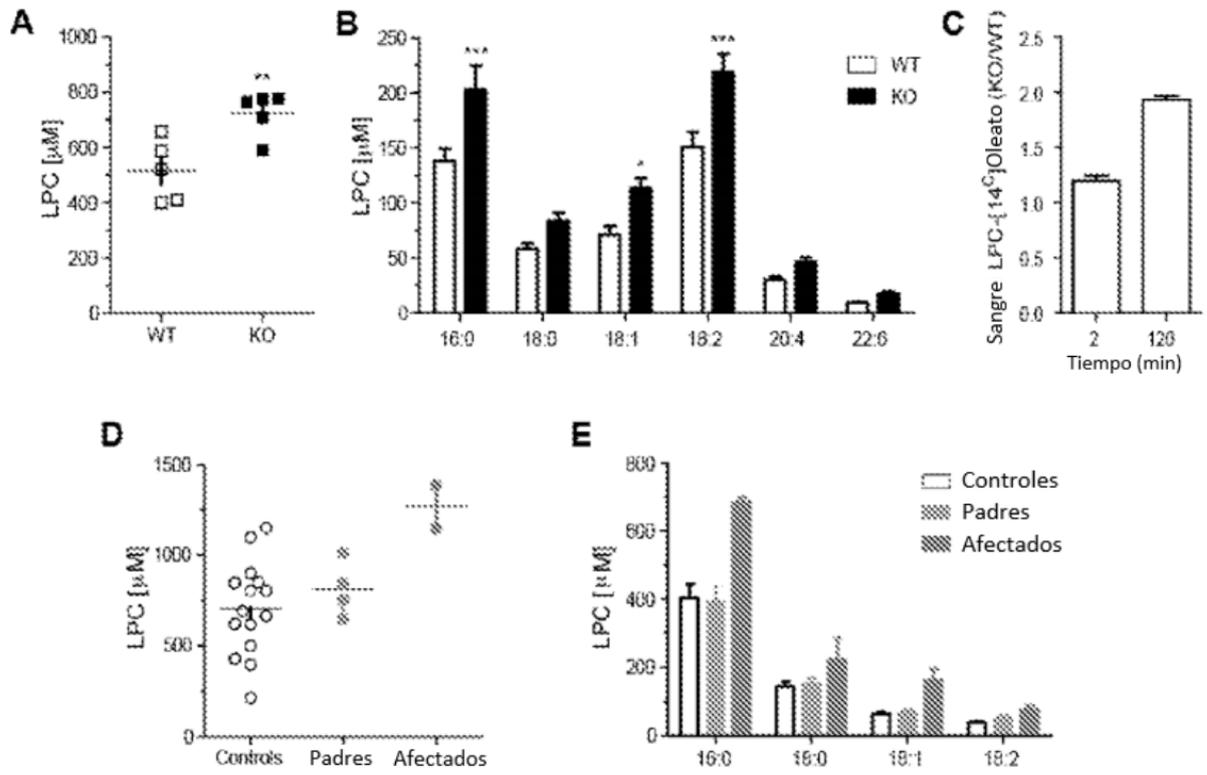


Fig. 25

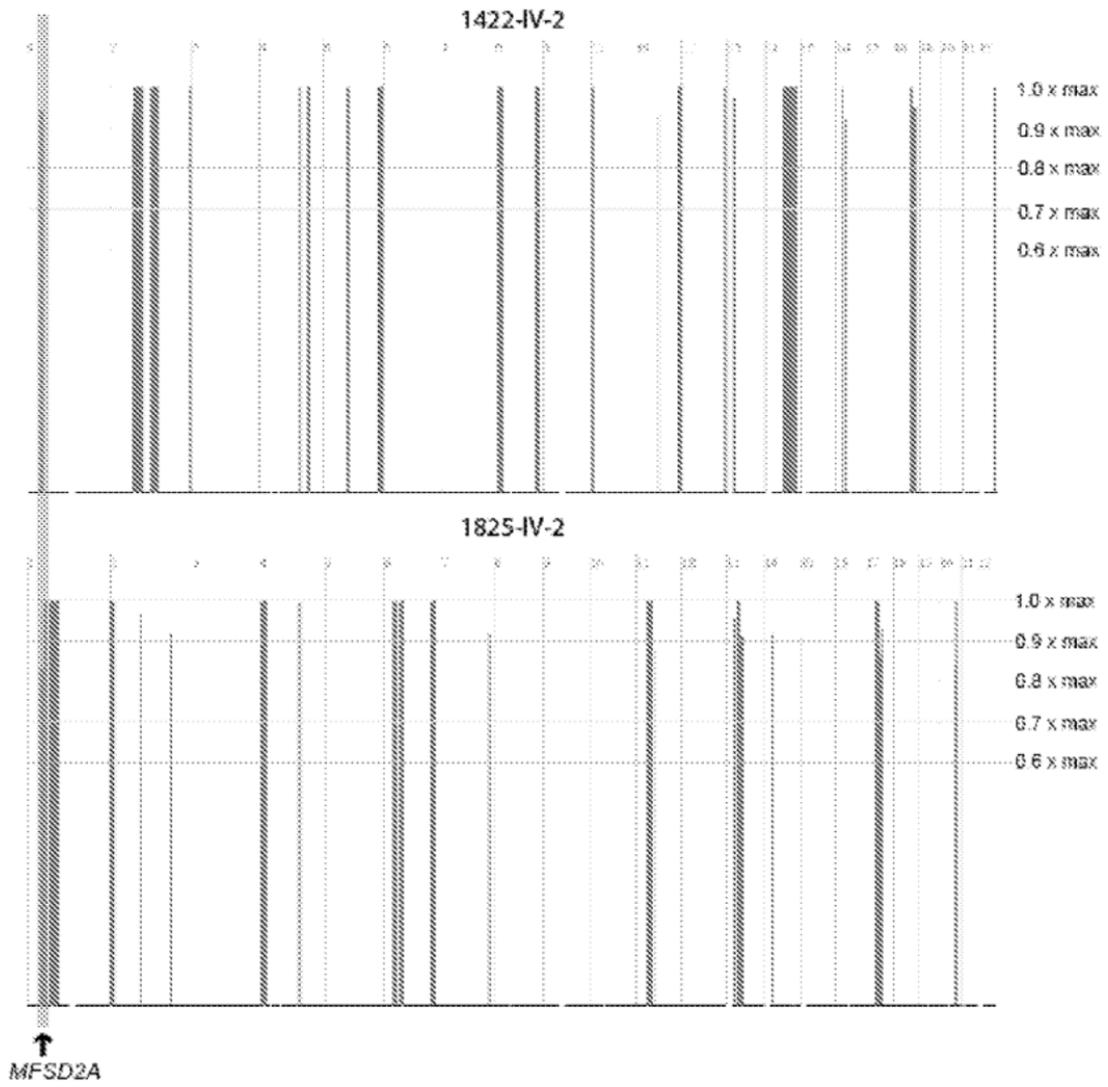


Fig. 26

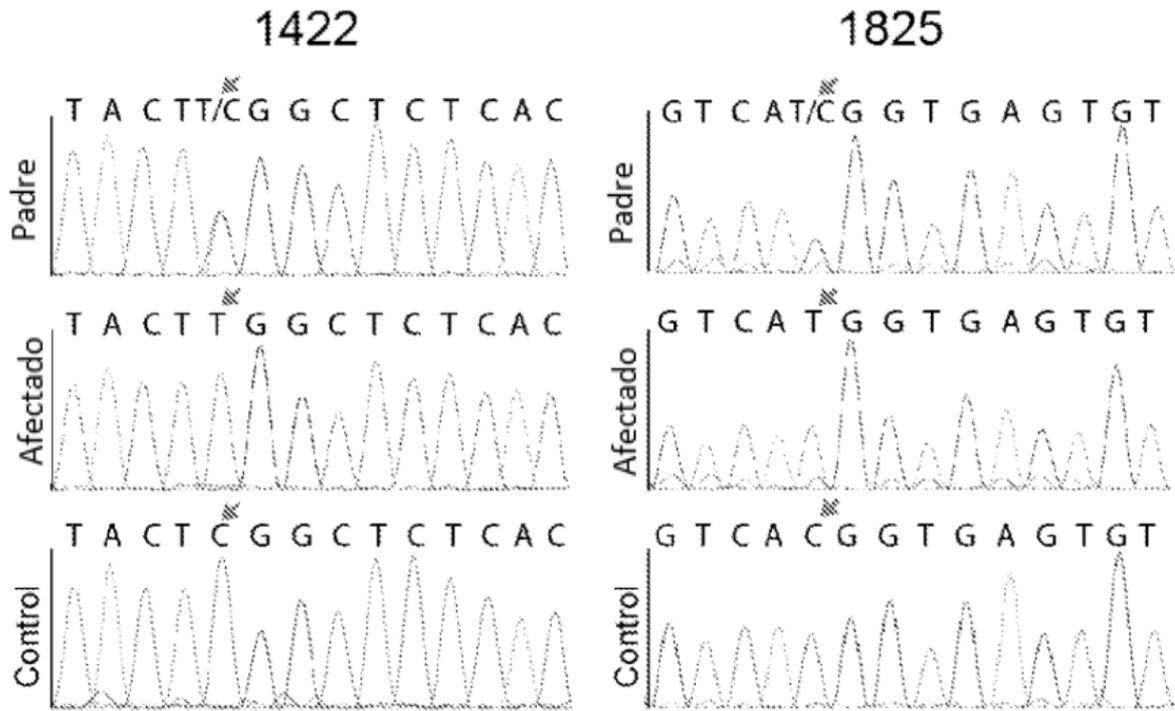


Fig. 27

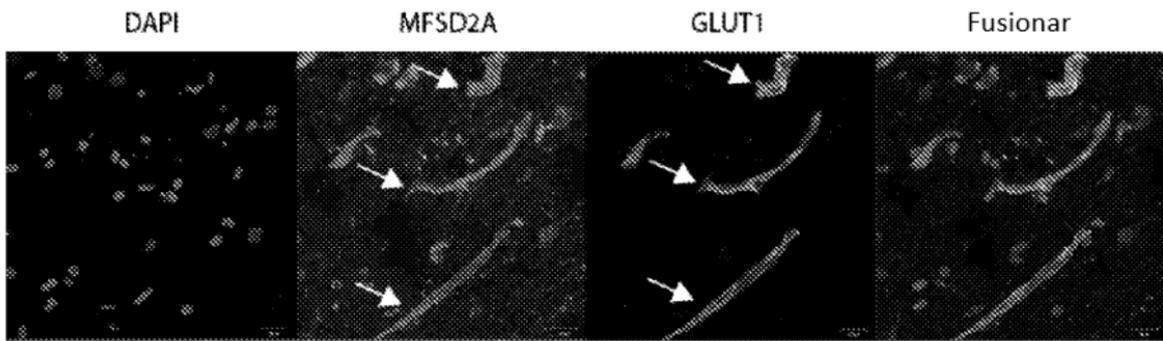


Fig. 28

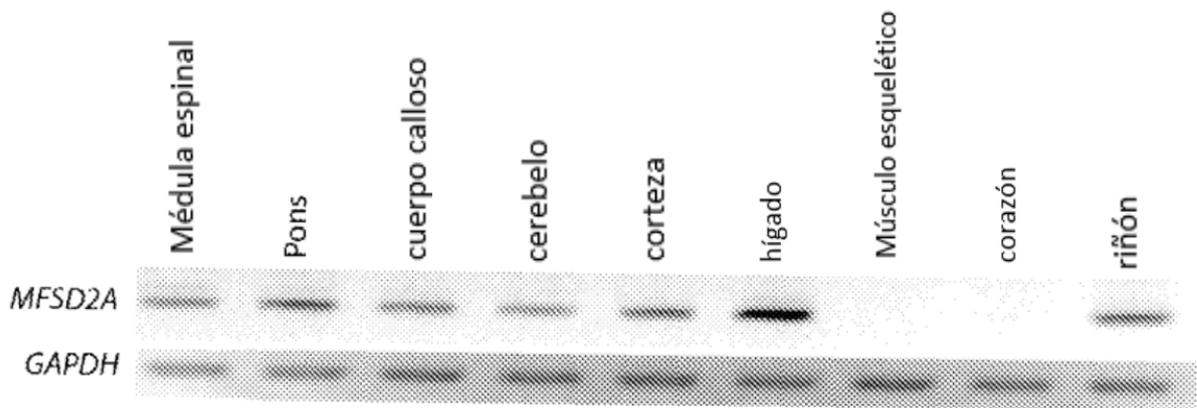


Fig. 29