

GFM1 MITOCURE:

TERAPIA PERSONALIZADA PARA LA MUTACION DEL
GEN GFM1 QUE CODIFICA EL FACTOR DE TRADUCCIÓN
MITOCONDRIAL EFG1



Investigador Principal: **José A Sánchez Alcázar**
CABD-CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain.
e-mail: jasanalc@upo.es
Teléfono: 646285371

Resumen

Las enfermedades mitocondriales abarcan un amplio espectro de trastornos musculares y neurodegenerativos, crónicos y progresivos, causadas por mutaciones en el ADN nuclear (ADNn) o mitocondrial (ADNmt), la mayoría de las cuales no tienen tratamiento eficaz. Entre estas patologías se encuentran las mutaciones en los genes nucleares implicados de la síntesis de proteínas mitocondriales. Dado que la traducción mitocondrial es esencial para la correcta expresión y organización de los complejos mitocondriales, estas mutaciones provocan graves alteraciones del sistema de producción energético celular. Un grupo de defectos en la síntesis de proteínas mitocondriales lo constituye el causado por mutaciones en el factor de elongación de la traducción mitocondrial G1 (GFM1) que codifica para la proteína EFG1 (Smeitink *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 2006;79(5):869–877; Valente *et al.* *Am. J. Hum. Genet.* 2007;80(1):44–58;).

A día de hoy, sólo se han publicado en la literatura una docena de casos de pacientes relacionados con alteraciones en GFM1. Además, los síntomas de estos pacientes varían enormemente, pudiendo presentar desde microcefalia, miopatía, retraso en el crecimiento, disfagia, encefalopatía, fallos hepáticos y acidosis.

El objetivo general de este proyecto es encontrar tratamientos personalizados eficaces utilizando fibroblastos y células neuronales derivados de los pacientes con mutaciones en el gen GFM1. Con este objetivo, proponemos la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos en ambos modelos celulares y la evaluación de la efectividad de una librería de compuestos farmacológicos comerciales en la mejora de estas alteraciones patológicas.

El cribado farmacológico personalizado se basa en la hipótesis de que diferentes mutaciones o la variación genética interindividual pueden contribuir significativamente tanto a la susceptibilidad a las enfermedades como a la respuesta a los tratamientos farmacológicos. El objetivo de la medicina personalizada es maximizar la probabilidad de la eficacia terapéutica y reducir al mínimo el riesgo de toxicidad de los medicamentos para un paciente individual.

Los objetivos del proyecto son eminentemente prácticos y se ajustan a las principales prioridades de investigación establecida por las asociaciones de pacientes ya que generará modelos celulares de la enfermedad, evaluará las cascadas moleculares que conducen a su desarrollo y tiene por objeto encontrar nuevas terapias personalizadas efectivas en los pacientes con mutaciones en el gen GFM1.

Hipótesis

Nuestra hipótesis es que el tratamiento personalizado *in vitro* de los fibroblastos y células neuronales derivados de los pacientes con mutaciones en el gen GFM1 con una amplia gama de opciones farmacológicas disponibles actualmente, y el seguimiento de su efecto sobre los cambios fisiopatológicos ayudará a una mejor y más objetiva elección terapéutica para los pacientes. El modelo también será útil para probar la eficacia de nuevas opciones terapéuticas desarrolladas en el futuro.

Objetivos específicos:

1) Caracterización de la fisiopatología de los fibroblastos derivados de pacientes con mutaciones en el gen GFM1.

Niveles de expresión del gen GFM1 y la proteína EFG1

Alteraciones en la síntesis de proteínas mitocondriales

Alteraciones de los complejos de la cadena respiratoria

Alteraciones bioenergéticas y estrés oxidativo

Alteraciones de la proteostasis/autofagia/mitofagia

Alteraciones del inflammasoma

Susceptibilidad a la muerte celular en medio respiratorio

Susceptibilidad a la senescencia

2) Cribado de fármacos en los fibroblastos con mutaciones en el gen GFM1. Evaluación de los fármacos capaces de mejorar las alteraciones fisiopatológicas. Específicamente realizaremos cribados de derivados del compuesto UPO-005 que ha dado resultados favorables en un cribado inicial. Así mismo, estudiaremos los mecanismos moleculares subyacentes en la actuación de los fármacos con efectos positivos.

3) Generación de células neuronales por reprogramación directa de los fibroblastos de pacientes con mutaciones en el gen GFM1. Para ello seguiremos protocolos previamente descritos (Vierbuchen et al, Nature. 2010; 463(7284): 1035–1041).

4) Los compuestos positivos en el cribado con los fibroblastos serán evaluados en las células neuronales diferenciadas.

Pacientes

Nuestra cohorte la incluyen 3 pacientes con mutaciones en el gen GFM1. El consentimiento informado revisado por el respectivo comité ético de la institución participante se obtendrá de acuerdo con la Declaración de Helsinki (BMJ 1991; 302, 1194).

Fármacos para el cribado

Los tratamientos se realizarán con los fármacos clasificados por sus mecanismos de acción terapéutica, y expuestos a continuación:

- a) Tratamientos para paliar el déficit energético: Riboflavina, Ubiquinona, Vitamina K3, Ascorbato, Succinato, Menadiol, Tiamina, Creatina, Uridina, Dicloroacetato, Succinato, Piruvato.
- b) Tratamientos para paliar el estrés oxidativo: EPI-743, Tocoferol, Ascorbato, Retinol, Menadiona, Ubiquinona, MitoQ, glutation, Ácido Lipoico, Omega 3, Omega 5.
- c) Activadores mitocondriales: Carnitina.
- d) Tratamientos para eliminar los metabolitos tóxicos: Tiamina, Carnitina, Dicloroacetato, Bicarbonato.
- e) Tratamientos que modulen la autofagia/ mitofagia: Rapamicina, Ciclosporina y una colección de 90 reguladores autofagia.
- f) Otros tratamientos: Cuerpos cetónicos
- g) Reguladores Inflamasoma: Ac-YVAD-cmk (Caspase-1 inhibitor); Bay11-7082 (NLRP3 Inflammasome Inhibitor); Glibenclamida (NLRP3 Inflammasome Inhibitor).
- h) Activadores de la biogénesis mitocondrial: AICAR, resveratrol, bezafibrato, nicotinamida...etc. (ver **tabla I**)
- i) Combinaciones de distintos tratamientos.

Los compuestos se evaluarán a 5 concentraciones, teniendo en cuenta la ED50 (la dosis o concentración que causa el 50% del máximo efecto biológico de interés) de cada compuesto (1/10 ED50, 1/2 ED50, 1x ED50, 2x ED50 y 10x ED50) o a la concentración establecida en la literatura. Los fibroblastos estarán expuestos a los diferentes fármacos al menos dos semanas.

Tabla I. Moduladores de la biogénesis mitocondrial

<p>Activadores de AMPK (AMP-activated protein kinase)</p>	<p>D942 (Chemdea), AICAR, AICA-Riboside, 5'-Phosphate, metformin, A-769662, AMPK Activator, PT 1, Phenformin hydrochloride (Santa Cruz), Nectandrin B, AMPK activator O304 (Betagenon), Ampkinone (Cayman Chemical)</p> <p>6,7-Dihydro-4-hydroxy-3-(2'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl)-6-oxo-thieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitrile (A-769662) (Otava); Acadesina, Phenformin hydrochloride, A-769662 (Selleck Chemicals)</p>
<p>Inhibidores de AMPK</p>	<p>A-769662, Acadesine, Phenformin hydrochloride (Selleckchem), Dihydrochloride (Chemdea), Compound C (Dorsomorphin) (Sigma)</p>
<p>Activadores de SIRT1 (Familia de sirtuinas deacetilasas de histonas)</p>	<p>Nicotinamide, Nicotinamide mononucleotide, Resveratrol , quercetin (Sigma) Inhibidores de PARP: PJ34 (Sigma) SRT1720 y SRT2104 (Sirtris Pharmaceuticals)</p>
<p>Activación de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)</p>	
<p>Activadores PPARα</p>	<p>Fibrates: Fenofibrato (Sigma)</p>
<p>Activadores PPARδ</p>	<p>L-165041(Merck); GW501516 (Glaxo SmithKline)</p>
<p>Activadores PPARγ</p>	<p>Tiazolidinediona: Rosiglitazona (Glaxo SmithKline) Ciglitazona (Biomol)</p>
<p>Activadores RxRx</p>	<p>Ácido retinoico (Sigma)</p>
<p>Activación del receptor relacionado con estrógenos (ERR)</p>	
<p>Activadores de ERRα</p>	<p>XCT790 (Sigma)</p>
<p>Activadores ERRγ</p>	<p>4-hidroxitamoxifeno (Sigma)</p>
<p>Activadores de la biogénesis mitocondrial por mecanismos no bien definidos: Aumento de expresión de PGC1α</p>	<p>Isoflavonas: daidzeina, genisteina, biochanin A (Sigma), formononetina (Sigma) hidroxi-tirosol (Nutrafur SA) Pirroloquinolina Quinona (Sigma) Ácido lipoico (Sigma)</p>

Presupuesto (duración: 1 año)

CONCEPTOS	AÑO 1
Bienes y Servicios:	
Cultivos Celulares	10.000
Anticuerpos & Western blotting	2.000
PCR cuantitativa	1.000
Reactivos Biología Molecular	500
Servicios de microscopía y citometría	1.000
Ensayos bioquímicos	3.000
Síntesis de proteínas mitocondriales	2.000
Cribado	6.000
Entrega de muestras	500
Reprogramación a neuronas	10.000
Total:	36.000
Personal:	
Becario	14.000
TOTAL	50.000 EUR

Grupo de investigación y las instalaciones a disposición para la parte experimental del proyecto.

Durante los últimos 15 años, el Dr. Sánchez Alcázar, PI del proyecto, ha estado trabajando en la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sanchez+alcazar>; https://www.researchgate.net/profile/Jose_Sanchez-Alcazar).

Estos estudios han llevado a la identificación del papel fundamental de la mitofagia en la fisiopatología de estas enfermedades. Por otra parte, sus estudios han demostrado el efecto beneficioso de la coenzima Q₁₀ y riboflavina en modelos celulares de las enfermedades mitocondriales.

Las instalaciones disponibles en el laboratorio del Dr. José Antonio Sánchez Alcázar, situado en el CABD son: Centrifugas, espectrofotómetro, material y equipo necesario para llevar a cabo RT-PCR; Material y equipo necesario para llevar a cabo Western

blotting, campanas de flujo laminar, equipo de HPLC, incubadores para células en cultivo- servicio de citometría de flujo y microscopía, instalaciones para trabajar con material radiactivo, equipo Seahorse, sistema de imagen automático IN Cell 2000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y estaciones automáticas para el manejo de líquidos.

Resultados preliminares

UPO-005 y derivados (006-009) recuperan parcialmente la expresión de la proteína GFM1 (Figura 1), la expresión de proteínas codificadas por el ADNmt (figura 1) y la supervivencia celular en medio respiratorio (Figura 2).

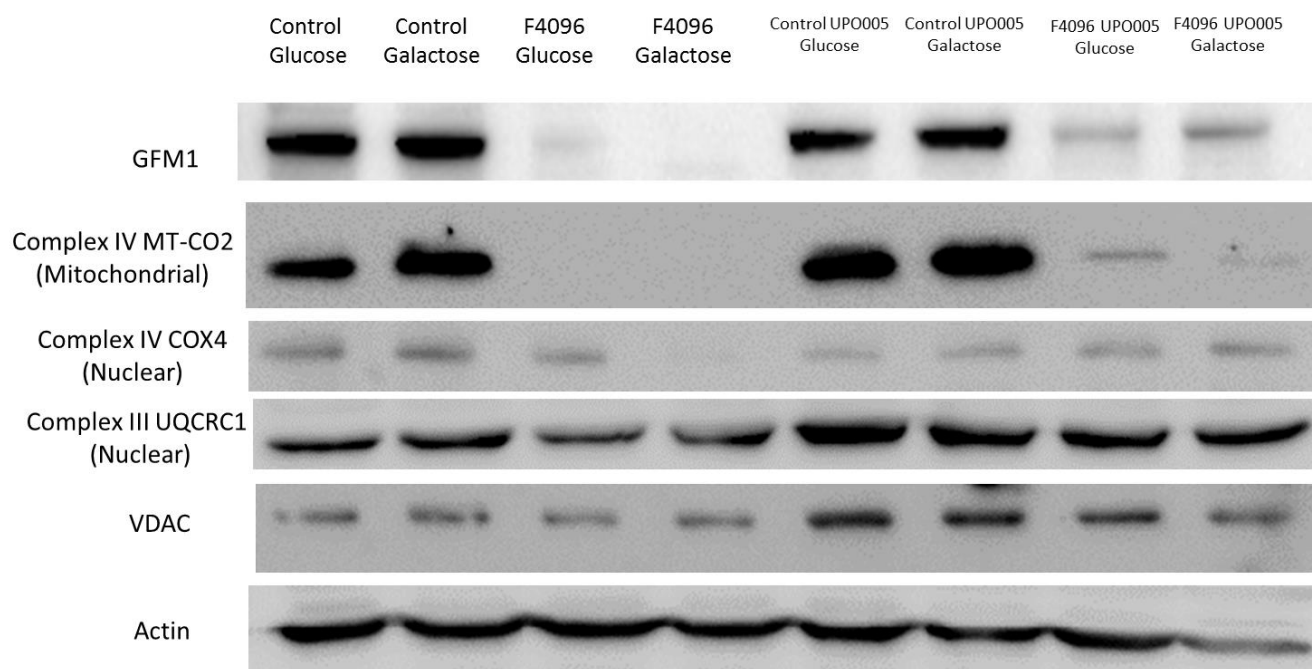


Figura 1. Western blotting representando la expresión de las proteínas mitocondriales GFM1, MT-CO2, COX4, UQCRC1 y VDAC utilizando extractos celulares de células control y células mutantes para el gen GFM1 (F4096). Las células fueron incubadas en medio con glucosa y medio respiratorio suplementado con galactosa. Las células fueron tratadas con UPO-005 durante 72 horas. La expresión de actina fue utilizada como control de carga. Obsérvese el aumento en la expresión de GFM1 y las proteínas codificadas por el mtADN tras el tratamiento.

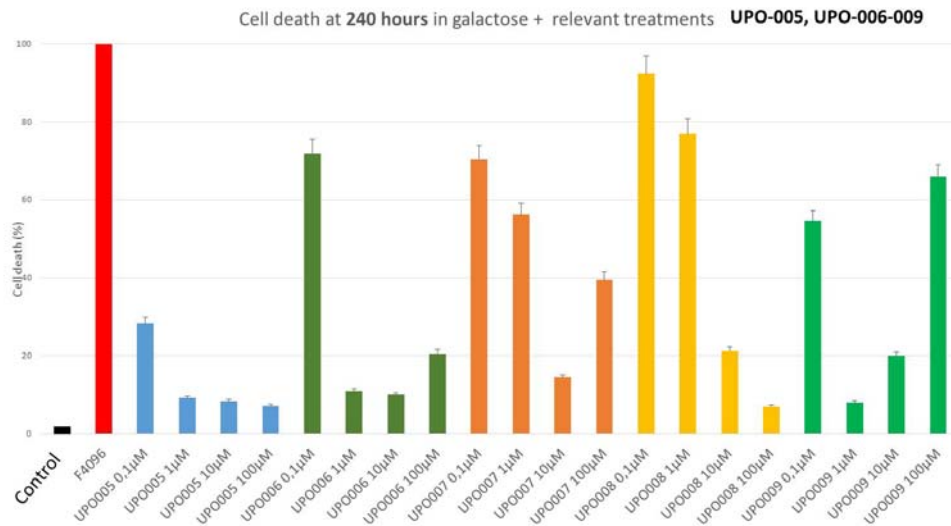


Figura 2. Muerte celular en medio respiratorio (con galactosa) de las células control y mutantes GFM1 (F4096). El 100% de las células mutantes mueren en medio respiratorio. El compuesto UPO-005 y derivados (006-009) protegen muy significativamente de la muerte celular en medio respiratorio.