



MITOCURE-KAT6B:

NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PERSONALIZADAS
PARA LOS SÍNDROMES ASOCIADOS AL GEN KAT6B



Investigador Principal: **José Antonio Sánchez Alcázar**

**CABD-CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Sevilla,
Spain. e-mail: jasanalc@upo.es
Teléfono: 954978071**



INTRODUCCIÓN

La Discapacidad intelectual (DI) o retraso global en el desarrollo (RGD) ocurre en 1%–3% de todos los niños. Variaciones en el número de copias de los genes y mutaciones raras (a menudo ligadas al cromosoma X o autosómicas recesivas) explican hasta el 25% de todos los casos. Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva del ADN, han surgido numerosas mutaciones monogénicas heterocigotas como la causa principal de diferentes síndromes de discapacidad intelectual y son responsables de hasta al 40% de las mutaciones graves de DI (1, 2). Las mutaciones en varios genes implicados en la regulación epigenética de la expresión génica han sido vinculadas a diferentes síndromes de DI incluyendo las alteraciones del gen de la lisina-acetiltransferasa 6B (KAT6B) que codifica la proteína lisina acetiltransferasa 6B que se encuentra altamente conservada. KAT6B pertenece a la familia de proteínas MSYT junto con KAT6A, KAT5, y KAT7; Los miembros de esta familia juegan un papel en la activación de la transcripción a través de la promoción de la acetilación de las histonas. La familia de proteínas MYST funciona en procesos celulares importantes, incluida la remodelación de la cromatina, la regulación génica, la traducción de proteínas, el metabolismo, y la replicación celular (3).

Las variantes truncadas de novo en el gen KAT6B son asociado con dos síndromes clínicos distintos descritos por una gama de fenotipos (4): Say-Barber-Biesecker-Joven-Simpson (SBBYSS; MIM# 603736) y Síndrome genitopatelar (GPS; MIM# 606170), con fenotipos intermedios que caen en un espectro entre estos dos síndromes. Principales características de SBBYSS incluyen características craneofaciales distintivas como blefarofimosis, fascies "tipo máscara", una nariz bulbosa con una amplia puente nasal, hipotonía, dificultades para alimentarse, pulgares largos y dedos gordos largos de los pies, discapacidad intelectual y retraso severo en el desarrollo. Las características principales de los GPS incluyen displasia esquelética, rótula ausente o hipoplásica, genitales ambiguos, anomalías anales, problemas renales, agenesia del cuerpo calloso con microcefalia, y retraso motor e intelectual severo. Finalmente, a pesar del estándar anterior de clasificación en GPS o SBBYSS, un número de personas muestran un intermedio fenotipo o un fenotipo no especificado (NOS).

En este proyecto proponemos evaluar la efectividad terapéutica de los distintos tratamientos que actúan a nivel mitocondrial en los fibroblastos derivados de los pacientes y en células neuronales generadas por reprogramación directa. Para conseguir este objetivo, estudiaremos los efectos de estos tratamientos sobre las alteraciones fisiopatológicas presentes en los fibroblastos y células neuronales derivadas de los pacientes.

En los modelos celulares generados estudiaremos la proliferación celular, las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial, los niveles de coenzima Q₁₀, los niveles de expresión de las proteínas mitocondriales, el potencial de membrana mitocondrial, y la activación de mitofagia y/o la apoptosis.

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 mitocondriales.

Hipótesis

Nuestra hipótesis propone que el tratamiento personalizado in vitro de los fibroblastos y células neuronales derivados de los pacientes KAT6B 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 los pacientes KAT6B.
- 2) Cribado de fármacos en los fibroblastos derivados de los pacientes KAT6B. Evaluación de los fármacos capaces de mejorar las alteraciones fisiopatológicas. 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 los pacientes KAT6B.
- 4) Los compuestos positivos en el cribado con los fibroblastos serán evaluados en las células neuronales diferenciadas.

Metodología

1) Caracterización de la fisiopatología de los fibroblastos derivados de los pacientes KAT6B. La selección de las alteraciones que permitan la evaluación de la efectividad de los tratamientos en el cribado farmacológico.

Tarea 1.1. Selección de las alteraciones fisiopatológicas apropiadas para la evaluación de la efectividad de los tratamientos en el cribado farmacológico:

Viabilidad en medio de estrés.

Niveles de expresión de la proteína mutada.

Alteraciones del patrón de expresión génica.

Alteraciones de la acetilación de las histonas.

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.

Los protocolos de los estudios están descritos en las publicaciones del grupo:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sanchez+alcazar>

1) Cribado de fármacos en los fibroblastos derivados de los pacientes KAT6B. Evaluación de los fármacos capaces de mejorar las alteraciones fisiopatológicas. Así mismo, estudiaremos los mecanismos moleculares subyacentes en la actuación de los fármacos con efectos positivos.

Tarea 2.1. Cribado de alto rendimiento. Los fibroblastos serán sembrados en placas de 24 pocillos. La distribución de reactivos de ensayo y medios de cultivo será realizada por una estación automática de manejo de líquidos (Biomek FX, Block). Posteriormente, ensayaremos una librería farmacológica utilizada con frecuencia en el tratamiento de los pacientes mitocondriales 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 and 10x ED50) o la concentración establecida utilizada en la literatura. Consideraremos compuestos positivos aquellos que sin ser tóxicos sean capaces de revertir más de un 75% las alteraciones fisiopatológicas en los fibroblastos derivados de los pacientes KAT6A.

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, glutatión, 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 Inflammasoma: 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.

i) Tratamientos para aumentar los niveles de coenzima A: pantotenato

j) Combinaciones de distintos tratamientos.

Los fibroblastos serán expuestos a los diferentes fármacos al menos dos semanas.

Tarea 2.2. Confirmación de la eficacia de los principios activos positivos seleccionados en el rescate de los defectos fisiopatológicos en los fibroblastos mutantes. Para confirmar el rescate de los compuestos positivos, se llevarán a cabo diferentes ensayos en los fibroblastos. Así, tras el tratamiento con los compuestos favorables seleccionados estudiaremos en profundidad la acetilación de las histonas, el patrón transcriptómico, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la mitofagia y la biogénesis mitocondrial, así como las tasas de apoptosis espontánea e inducida.

2) Generación de células neuronales por reprogramación directa de los fibroblastos de los pacientes mitocondriales.

Para la reprogramación directa, seguiremos protocolos descritos previamente en la literatura (5-8). Utilizaremos vectores lentivirales que contienen factores de transcripción específicos del linaje neural. Los fibroblastos derivados de los pacientes se incubarán en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina al 0.1%. El día siguiente, las células se infectarán con un conjunto de vectores lentivirales que contienen factores de transcripción específicos del linaje neural, tales como *Acs1* y *Brn2*. Tres días después de la transducción viral, el medio de los fibroblastos será reemplazado por un medio de diferenciación neuronal complementado con factores de crecimiento específicos neuronales. La mitad del medio de conversión neuronal se reemplazará cada 2-3 días. Veinticinco días después de la infección, las células neuronales se identificarán mediante la expresión de TAU y la proteína citoesquelética específica de neuronas MAP2. Las células DAPI+, MAP2+ y TAU+ se considerarán neuronas inducidas. El ensayo de caracterización neuronal se realizará mediante inmunocitoquímica y RT-PCR cuantitativa.

La acetilación de las histonas, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la mitofagia, la biogénesis mitocondrial, las alteraciones bioenergéticas y la apoptosis inducida o espontánea serán examinadas en las neuronas inducidas control y mutantes.

4) Los compuestos positivos en el cribado fibroblastos serán evaluados en la restauración de las alteraciones patológicas en las células neuronales mutantes.

Después de obtener los cultivos neuronales estas serán sometidas a diferentes ensayos para observar cualquier alteración en la proliferación y la fisiopatología de las células portadoras de las mutaciones particulares.

Análisis estadístico

La calidad y robustez del cribado de alto rendimiento se determinará calculando el factor Z como describen Zhang et al. (9). Consideraremos la calidad del ensayo como aceptable cuando el valor del factor Z se encuentre entre 0,5 y 1. El análisis estadístico incluirá el test "t" de Student y el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SSPS (Statistical Package for the Social Sciences).

Equipo de investigación:

El equipo de trabajo está formado por 2 estudiantes de doctorado: Marta Talaverón Rey, licenciada en Biología y Diana Reche López, licenciada en Bioquímica.

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 búsqueda de tratamientos para las enfermedades raras:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sanchez+alcazar>;

https://www.researchgate.net/profile/Jose_Sanchez-Alcazar

Las instalaciones disponibles en el laboratorio del Dr. José Antonio Sánchez Alcázar, situado en el CABD son: Centrífugas, 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.

José Antonio Sánchez Alcázar

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo(CABD)-CSIC

Universidad Pablo de Olavide.

Carretera de Utrera Km 1, Sevilla 41013, Spain.

Phone: 34 954978071. FAX: 34 954349376. Email: jasanalc@upo.es;

<https://sanchezalcazarlab.com/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=sanchez+alcazar&sort=pubdate>

<https://www.researchgate.net/profile/Jose-Sanchez-Alcazar>

Referencias

1. Gilissen, C., Hahir-Kwa, J. Y., Thung, D. T., van de Vorst, M., van Bon, B. W., Willemsen, M. H., Kwint, M., Janssen, I. M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Tearle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H. G., de Vries, B. B., Kleefstra, T., Brunner, H. G., Vissers, L. E., and Veltman, J. A. (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* **511**, 344-347
2. Moeschler, J. B., Shevell, M., and Committee on, G. (2014) Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* **134**, e903-918
3. Voss, A. K., Collin, C., Dixon, M. P., and Thomas, T. (2009) Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity. *Developmental cell* **17**, 674-686

4. Yabumoto, M., Kianmahd, J., Singh, M., Palafox, M. F., Wei, A., Elliott, K., Goodloe, D. H., Dean, S. J., Gooch, C., Murray, B. K., Swartz, E., Schrier Vergano, S. A., Towne, M. C., Nugent, K., Roeder, E. R., Kresge, C., Pletcher, B. A., Grand, K., Graham, J. M., Jr., Gates, R., Gomez-Ospina, N., Ramanathan, S., Clark, R. D., Glaser, K., Benke, P. J., Cohen, J. S., Fatemi, A., Mu, W., Baranano, K. W., Madden, J. A., Gubbels, C. S., Yu, T. W., Agrawal, P. B., Chambers, M. K., Phornphutkul, C., Pugh, J. A., Tauber, K. A., Azova, S., Smith, J. R., O'Donnell-Luria, A., Medsker, H., Srivastava, S., Krakow, D., Schweitzer, D. N., and Arboleda, V. A. (2021) Novel variants in KAT6B spectrum of disorders expand our knowledge of clinical manifestations and molecular mechanisms. *Mol Genet Genomic Med* **9**, e1809
5. Drouin-Ouellet, J., Lau, S., Brattas, P. L., Rylander Ottosson, D., Pircs, K., Grassi, D. A., Collins, L. M., Vuono, R., Andersson Sjolund, A., Westergren-Thorsson, G., Graff, C., Minthon, L., Toresson, H., Barker, R. A., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2017) REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO molecular medicine* **9**, 1117-1131
6. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Bjorklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2011) Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10343-10348
7. Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D. A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., Bjorklund, A., Grealish, S., and Parmar, M. (2013) Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 7038-7043
8. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041
9. Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* **4**, 67-73