



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Colesterol/glicoesfingolípidos mitocondriales en hígado y cerebro y alteración del metabolismo contribuyen a la patología de la enfermedad de Niemann Pick tipo C y caveolinopatías

Dr. José Carlos Fernández Checa

CSIC Consell Superior d'Investigacions Científiques
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Dr. Albert Pol Sorolla

IDIBAPS. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer





1. Resumen del proyecto

La enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC) es una enfermedad lisosomal compleja-caracterizada por alteraciones neurológicas (ataxia, cataplexia, alteraciones motoras y demencia supranuclear), hepatoesplenomegalia y enfermedad hepática. En algunos casos, los pacientes desarrollan un fallo hepático fulminante incluso antes de que se manifiesten los síntomas neurológicos. A nivel molecular, la enfermedad de NPC está causada por mutaciones en la proteína endolisosomal NPC1/NPC2, cuyo papel es regular la distribución y tráfico de colesterol/glicoesfingolípidos (GSL), que acaban acumulándose en los tejidos afectados (hígado y cerebro). Las caveolinopatías engloban un conjunto de enfermedades neurodegenerativas cuyos síntomas son similares a los de la enfermedad de NPC y que están determinados por la pérdida funcional de caveolina-1 (CAV1), una proteína clave que determina microdominios específicos en las bicapas lipídicas, caracterizados por la presencia de colesterol y GSL. Puesto que la disfunción mitocondrial contribuye a muchas enfermedades degenerativas y hepáticas, y ya que la deficiencia de NPC1 y CAV1 inducen el incremento de colesterol mitocondrial, nuestra hipótesis establece que el acúmulo de colesterol mitocondrial es un factor clave para el desarrollo de la enfermedad de NPC y de las caveolinopatías. El propósito global de este proyecto es probar esta hipótesis utilizando como modelos experimentales ratones deficientes en NPC1 y CAV1, así como fibroblastos y linfocitos de pacientes con enfermedad de NPC para determinar la función mitocondrial y la defensa antioxidante, así como el análisis lipidómico y su impacto en los hepatocitos y las células de Purkinje. Asimismo, hemos analizado el papel de la recuperación de la defensa antioxidante en la función mitocondrial, del peso corporal y de la supervivencia en modelos experimentales de NPC y caveolinopatías.

2. Resultados principales

Colesterol y defensa antioxidante mitocondrial en ratones deficientes en NPC y CAV1

Como muchas enfermedades lisosomales, la enfermedad NPC se caracteriza por alteraciones lisosomales y acumulación de colesterol y GSL. La deficiencia de CAV1 no solo influye en la distribución intracelular de colesterol, sino que tiene también impacto en la capacidad energética del hepatocito en el hígado regenerante, sugiriendo una alteración mitocondrial. Aunque el colesterol y los GSL son componentes integrales de las membranas lipídicas, su acumulación en mitocondria no solo repercute en su función al desacoplar el consumo de oxígeno con la fosforilación oxidativa, sino que interfiere en la actividad de transportadores mitocondriales específicos, incluyendo el transporte de GSH del citosol a la mitocondria, lo que provoca la disminución del GSH mitocondrial (mGSH). Para evaluar el impacto de la deficiencia de NPC1 y CAV1 en la fisiología mitocondrial, hemos examinado el nivel de colesterol mitocondrial, así como la función y defensa antioxidante mitocondrial a partir de hígado y cerebro de ratones deficientes en NPC1 y CAV1. En particular, nos enfocamos en el nivel de mGSH, porque es conocido que su transporte es sensible a las propiedades dinámicas de la membrana mitocondrial. Los resultados obtenidos indican la acumulación de colesterol en la membrana mitocondrial interna en ambos modelos (NPC1 y CAV1 KO), que se correlaciona con una menor tasa de transporte de GSH del citosol a la mitocondria, dando lugar a la disminución del nivel de mGSH, pérdida de fluidez de la membrana mitocondrial y una alteración entre los estados 3 y 4 en la respiración mitocondrial, que conlleva una disminución del cociente de control por aceptor en la presencia de ADP, sugiriendo una disfunción mitocondrial. Finalmente, hemos demostrado en fracciones del ER y MAM de hígado de ratón que CAV1 es una proteína residente en dichos dominios y que la ausencia de CAV1 en MAM aumenta significativamente el nivel de colesterol. Esos dominios MAM son muy activos metabólicamente y juegan un papel clave en el transporte de iones y lípidos entre el ER y la mitocondria.

Efecto del éster etílico de GSH sobre los niveles de mGSH, susceptibilidad al estrés oxidativo y función mitocondrial en hepatocitos y en células de Purkinje

El GSH regula múltiples funciones celulares, principalmente la defensa antioxidante al actuar en el ciclo redox dependiente del GSH. Para examinar las consecuencias del mGSH en la susceptibilidad al estrés oxidativo, primero hemos establecido las estrategias que permiten la recuperación del mGSH a pesar del incremento de colesterol. Asimismo, examinamos con mayor precisión el impacto de la disminución del mGSH en la función mitocondrial utilizando respirometría de alta resolución (HHR). El tratamiento con éster etílico de GSH (GSHee) recupera el nivel de mGSH tanto en hígado como cerebro de ratones deficientes en NPC, observándose un efecto similar en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de NPC y en los hepatocitos primarios deficientes en NPC. A diferencia del GSHee, la N-acetilcisteína (NAC) es incapaz de incrementar el nivel de mGSH, ya sea en hígado, en cerebro o en hepatocitos aislados.

Se realizó el análisis de HRR en homogenados hepáticos NPC^{+/+} (ratones controles), NPC^{-/-} y NPC^{-/-} tratados *in vivo* con GSHee. Al determinar el consumo de oxígeno del estado 2 de respiración (en ausencia de ADP) y tras añadir los sustratos del complejo I, malato y glutamato, al medio de respiración, se observó una disminución significativa en el consumo de oxígeno en NPC^{-/-} comparado con ratones NPC^{+/+}. El tratamiento con GSHee no modificó los parámetros anteriores. Resultados similares se observaron en presencia de rotenona (inhibidor del complejo I) y succinato (sustrato del complejo II). De manera similar, la respiración acoplada determinada como el consumo de oxígeno en presencia de oligomicina para inhibir la ATPsintasa y la máxima transferencia electrónica (ETS) en presencia del desacoplante FCCP, mostraron una disminución en hígado en los ratones NPC^{-/-} que no se recuperó con el tratamiento con GSHee. Un análisis similar de HRR en homogenados de cerebelo de ratones NPC^{+/+}, NPC^{-/-} y NPC^{-/-} tratados con GSHee estableció diferencias significativas entre los diferentes grupos, al contrario de lo observado en muestras de hígado. En este último caso, observamos que la

fosforilación oxidativa con sustratos del complejo I disminuye en NPC^{-/-} comparado con NPC^{+/+}, efecto que es revertido con el tratamiento con GSHee. Las diferencias utilizando sustratos del complejo II mostraron una tendencia similar entre NPC^{-/-} y NPC^{+/+}, con la capacidad del GSHee de prevenir dichas alteraciones.

Los resultados de la función mitocondrial en hígado se acompañaron de una disminución en la expresión de los complejos mitocondriales, en particular del complejo IV (citocromo C oxidasa) y del complejo V, que no se revirtieron con el tratamiento con GSHee. Sin embargo, no se detectaron cambios sustanciales en la expresión de estos mismos complejos en el cerebro de NPC^{-/-} comparado con el de NPC^{+/+}.

En los fibroblastos humanos de pacientes con la enfermedad de NPC se observó una reducción significativa de la función mitocondrial, acoplada y en el estado ETS de máxima transferencia electrónica, comparándola con los fibroblastos de sujetos sanos.

Calbindina es una proteína esencial en la función de la coordinación motora e integración sensorial que se expresa principalmente en cerebelo y células de Purkinje. La disminución en la expresión de calbindina, por tanto, desencadena deficiencias en la coordinación motora. Un análisis mediante inmunohistoquímica para revelar la presencia de calbindina mostró una disminución de su nivel en muestras de cerebelo de ratones NPC^{-/-} con respecto a los ratones controles NPC^{+/+}. Sin embargo, tras el tratamiento de los ratones NPC^{-/-} con GSHee se observó un incremento del nivel de calbindina en células de Purkinje. Dichos resultados corroboraban las observaciones del nivel de nitrosilación en residuos de proteínas de células de Purkinje en ratones NPC^{-/-} tras el tratamiento con GSHee.

El tratamiento con GSHee revierte las alteraciones del patrón de GSL en cerebro de ratones deficientes en NPC

Hemos observado un incremento del nivel de colesterol mitocondrial, tanto en hígado como en cerebro de ratones deficientes en NPC. En línea con dichas observaciones, un análisis por microscopía confocal mostró un incremento de colesterol libre en mitocondria de los fibroblastos de pacientes con NPC y en hepatocitos de ratones NPC^{-/-}, que se confirmó a nivel bioquímico mediante un análisis por HPLC. Asimismo se observó un incremento del gangliósido GD3 en mitocondria de hígado de ratón NPC^{-/-} que colocalizaba con el colesterol libre. Dichos resultados se correlacionan con la expresión de proteínas envueltas en la regulación del tráfico de colesterol a la mitocondria, observándose un incremento en la expresión de mRNA de StARD1, que es normalizado tras el tratamiento con GSHee. Por otra parte, el nivel de mRNA de MLN64 disminuyó en hígado deficiente en NPC, así como la expresión de CAV1 tanto en hígado como en cerebro, efecto que fue revertido por el tratamiento con GSHee.

Además, el nivel de especies moleculares de esfingolípidos determinados por espectroscopía de masas, exhibe cambios significativos, tanto en hígado como en cerebro de ratón deficiente en NPC, en particular de esfingomielina y GSL. Dichos cambios fueron revertidos en el cerebro deficiente en NPC tras el tratamiento con GSHee.

El tratamiento con GSHee prolonga la supervivencia y la capacidad motora en ratones deficientes en NPC

Para verificar el impacto que la recuperación de los niveles de mGSH con GSHee ejerce en la patología de la enfermedad NPC, ratones NPC^{-/-} fueron tratados con GSHee desde el día 7 de su nacimiento. Los resultados observados indican que el tratamiento con GSHee mejora dos pruebas funcionales de actividad motora, incluyendo el test Hanging, particularmente a las 8 semanas de tratamiento, obteniéndose una mejor puntuación en los ratones tratados con GSHee con respecto a los no tratados (3,2 vs. 2,1, p<0,05). Con respecto al test Beam, también se observa una mejoría significativa en los ratones NPC^{-/-} tratados con GSHee, en

especial a las 6 semanas de tratamiento. Además de estos resultados, los ratones NPC^{-/-} tratados con GSHee mostraron un incremento en el peso corporal respecto a los ratones tratados con suero. De mayor relevancia es que el tratamiento con GSHee prolongase la supervivencia desde los 69 días en los no tratados hasta los 117 días en los tratados. El tratamiento del ratón NPC^{-/-} con el precursor de GSH, NAC, fue incapaz de mostrar un efecto significativo en la supervivencia (76 días), lo que refleja la incapacidad del NAC de incrementar el nivel de mGSH y de mejorar la función mitocondrial. Finalmente, el tratamiento de los ratones NPC^{-/-} con 2-hidroxiopropilciclodextrina (CDX), prolongó su supervivencia hasta los 118 días, siendo similar su efecto al ejercido por el GSHee, mientras que la combinación CDX y GSHee no mostró un efecto sinérgico con respecto a los dos tratamientos por separado. Sin embargo, el tiempo en el que se mantuvo una supervivencia del 50% fue distinto entre los distintos grupos siendo mayor en el tratado con CDX que con GSHee.

3. Relevancia clínica e implicaciones

Una de las características más importantes de la enfermedad de NPC y las causadas por mutaciones en CAV1 es la alteración en el tráfico intracelular de colesterol y GSL, así como la perturbación en la función lisosomal. Sin embargo, la contribución y el papel de la disfunción mitocondrial en dichas enfermedades no se ha establecido hasta el momento. Nuestra aproximación, en este sentido, ha sido examinar la distribución del colesterol y GSL en mitocondria y su impacto en la función mitocondrial, el nivel de mGSH y la defensa antioxidativa, así como las consecuencias en los síntomas neurológicos y en la supervivencia en modelos experimentales de esas enfermedades.

Nuestros resultados muestran por primera vez que el tratamiento de ratones deficientes en NPC con GSHee recupera el nivel de mGSH tanto en hígado como en cerebro, repercutiendo en la recuperación de la función mitocondrial y la

protección frente al estrés oxidativo, con unos efectos similares observados en fibroblastos de pacientes con la enfermedad NPC. El tratamiento con GSHee mejora la función del cerebelo, reflejada en la recuperación de la integración sensorial y coordinación motora y, en especial, en la prolongación de la supervivencia de los ratones deficientes en NPC. Dada la capacidad del GSHee de atravesar la barrera hematoencefálica, estos hallazgos suponen un avance en el tratamiento de la enfermedad NPC y de las caveolinopatías mediante el tratamiento con GSHee.

4. Publicaciones generadas

Bosch M, Marí M, Herms A, Fernández A, Fajardo A, Kassan A, Giralt A, Colell A, Balgoma D, Barbero E, González-Moreno E, Matias N, Tebar F, Balsinde J, Camps M, Enrich C, Gross SP, García-Ruiz C, Pérez-Navarro E, Fernández-Checa JC, **Pol A.**
Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility.
Curr. Biol. 21: 681-6, 2011.

Bosch M, Marí M, Gross SP, Fernández-Checa JC, **Pol A.**
Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease.
Traffic 12: 1483-9, 2011.

Moles A, Tarrats N, Fernandez-Checa JC, Mari M.
Cathepsin B overexpression due to acid sphingomyelinase ablation promotes liver fibrosis in Niemann-Pick Disease.
J. Biol. Chem. 287: 1178-1188, 2012.

von Montfort C, Matias N, Fernandez A, Fucho R, Conde de la Rosa L, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Machida K, Tsukamoto H, Murphy MP, Mansouri A, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, **Fernandez-Checa JC**.

Mitochondrial GSH determines the toxic or therapeutic potential of superoxide anion scavenging in steatohepatitis.

J. Hepatol. 57:852-859, 2012.

Barbero-Camps E, Fernández A, Martínez L, **Fernández-Checa JC**, Colell A.

APP/PS1 mice overexpressing SREBP-2 exhibit combined A β accumulation and tau pathology underlying Alzheimer's disease.

Hum. Mol. Genet. 22: 3460-3476, 2013.

Herms A, Bosch M, Ariotti N, Reddy BJ, Fajardo A, Fernández-Vidal A, Alvarez-Guaita A, Fernández-Rojo MA, Rentero C, Tebar F, **Enrich C**, Geli MI, Parton RG, Gross SP, **Pol A**.

Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity.

Curr. Biol. 23: 1489-96, 2013.

Kassan A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJ, Fajardo A, Gelabert-Baldrich M, Tebar F, **Enrich C**, Gross SP, Parton RG, **Pol A**.

Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains.

J. Cell. Biol. 203: 985-1001, 2013.

Fernandez A, Matias N, Fucho R, Ribas V, Montfort CV, Nuño N, Baulies A, Martinez L, Tarrats N, Mari M, Colell A, Morales A, Dubuquoy L, Mathurin P, Bataller R, Caballeria J, Elena M, Balsinde J, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, **Fernandez-Checa JC**.

ASMase is Required for Chronic Alcohol Induced Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Cholesterol Loading.

J. Hepatol. 59: 805-813, 2013.

García-Ruiz C, Baulies A, Mari M, García-Rovés PM, **Fernandez-Checa JC**.
Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: cause or consequence?

Free Radic. Res. Nov; 47(11):854-68, 2013.

Pol A, Gross SP, Parton RG.

Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites.

J. Cell. Biol. 204: 635-46, 2014.

Barbero-Camps E, Fernández A, Baulies A, Martínez L, **Fernández-Checa JC**, Colell A.

Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid β neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking.

Am. J. Pathol. Jul; 184(7):2066-8, 2014.

Fucho R, Martínez L, Baulies A, Torres S, Tarrats N, Fernandez A, Ribas V, Astudillo AM, Balsinde J, Garcia-Rovés P, Elena M, Bergheim I, Lotersztajn S, Trautwein C, Appelqvist H, Paton AW, Paton JC, Czaja MJ, Kaplowitz N, **Fernandez-Checa JC**, García-Ruiz C.

ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis.

J. Hepatol. Nov; 61(5):1126-34, 2014.

Ribas V, García-Ruiz C, **Fernández-Checa JC**.

Glutathione and mitochondria.

Front. Pharmacol. Jul 1; 5:151, 2014.

Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, **Fernández-Checa JC**.

Mitochondrial cholesterol accumulation in alcoholic liver disease: Role of ASMase and endoplasmic reticulum stress.

Redox Biol. 3:100-8, 2014.

Garcia-Ruiz C, Mato JM, Vance D, Kaplowitz N, **Fernández-Checa JC.**

Acid sphingomyelinase-ceramide system in steatohepatitis: a novel target regulating multiple pathways.

J. Hepatol. Jan; 62(1):219-33, 2015.

Garcia-Ruiz C, Morales A, **Fernández-Checa JC.**

Glycosphingolipids and cell death: one aim, many ways.

Apoptosis 20: 607-20, 2015.

Torres S, Matias N, Baulies A, Levade T, Enrich C, Pol A, Sorice M, Malorni V, Garcia-Ruiz C, **Fernandez-Checa JC.**

Mitochondrial GSH repletion as a novel therapeutic approach in Niemann Pick type C disease.

Manuscrito en preparación.