

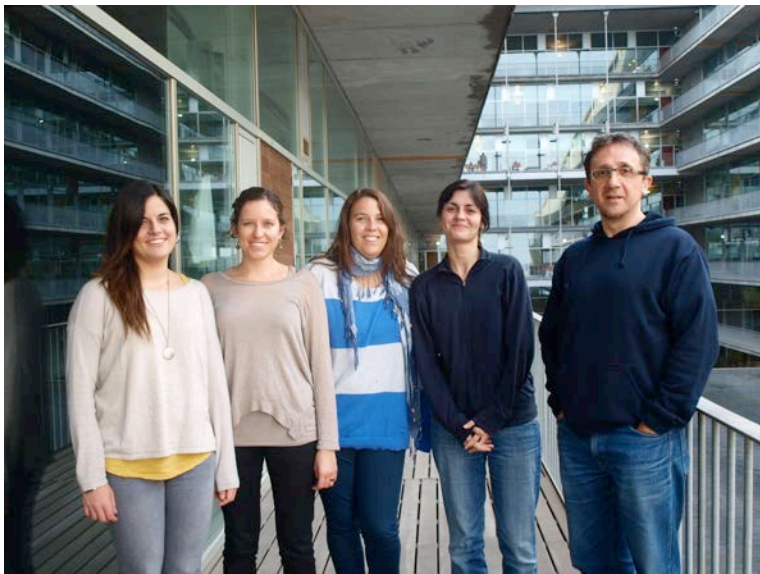


**Fundació**  
La Marató de TV3  
XVI SIMPOSIUM  
Enfermedades minoritarias

## Estudio del papel del estrés nitrooxidativo en la formación de oligómeros y fibras de A $\beta$ y su toxicidad en el músculo esquelético en la miopatía de cuerpos de inclusión tipo 2

**Dr. Francisco J. Muñoz López**

Institución: Universitat Pompeu Fabra (Barcelona)



## 1. Resumen del proyecto

La miopatía de cuerpos de inclusión tipo 2 (antiguamente llamada IBM2 y en la actualidad conocida como miopatía GNE) es una enfermedad producida por la mutación del gen GNE, que codifica para la enzima que cataliza las dos primeras reacciones en la producción del ácido siálico. Por mecanismos desconocidos se produce la degeneración de la musculatura esquelética, atrofia progresiva y finalmente una discapacidad muy grave. Ya que existen muchas evidencias de la acumulación intracelular de péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) en células musculares esqueléticas, en el presente proyecto hemos estudiado los mecanismos que llevan a la acumulación y agregación intracelular de los péptidos A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en células musculares esqueléticas y sus efectos sobre la viabilidad celular. Este estudio ha tenido los siguientes objetivos: 1) estudio de la acumulación y agregación intracelular de A $\beta$  y su efecto sobre la citotoxicidad; 2) estudio de la producción de estrés nitrooxidativo por los diferentes péptidos A $\beta$  y sus agregados en células musculares esqueléticas; 3) estudio de la expresión de BACE1 (la enzima clave en la producción de A $\beta$ ) y la producción de A $\beta$  por las SAPK (*stress activated protein kinases*); 4) estudio de los genes involucrados en la citotoxicidad de A $\beta$  mediante la sobreexpresión de A $\beta$  en levaduras.

El material biológico han sido cultivos de líneas celulares de mioblastos (y miotubos cuando están diferenciados) C2C12 (línea celular de mioblastos de ratón) y células de mioblasto humano con la mutación en el gen GNE y sin mutación; muestras de tejido muscular humano de una paciente con miopatía GNE y de una donante control, y levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Nuestros resultados demuestran que la miopatía GNE produce un aumento de BACE1 por estrés celular que desencadena una mayor producción de A $\beta$ . Este es secretado, aunque rápidamente se une al GM1 que está sializado, favoreciéndose su endocitosis por clatrina siguiendo la vía lisosomal, donde con pH ácido comienza a agregar, produciendo estrés oxidativo. Este estrés aumenta la

actividad de BACE1 a través de las SAPK (c-jun y MAPK-38) e induce daños celulares que impiden la activación de Akt, favorecen la activación de GSK3 $\beta$  y disparan apoptosis. Finalmente, con todas las dianas celulares identificadas como claves en la protección y toxicidad del amiloide, nuestro grupo continuará estudiando estas proteínas y su función protectora.

## **2. Resultados**

### **2.1. El amiloide intracelular en miocitos de pacientes con miopatía GNE y sus efectos sobre la viabilidad celular**

Utilizando miocitos de pacientes con miopatía GNE y de individuos sanos hemos encontrado un aumento de la concentración de A $\beta$  intracelular en las células procedentes de pacientes de miopatía GNE. Esto se correlaciona con una mayor producción de A $\beta$  (aumento de la actividad de BACE1) y un aumento en la endocitosis del mismo mediada por clatrina. De forma interesante hemos encontrado que A $\beta$  intracelular en las células de pacientes con miopatía GNE se encuentra agregado en forma de oligómeros, principalmente como dímeros y trímeros, que son los estados de agregación más tóxicos de A $\beta$ .

Consecuentemente hemos hallado que A $\beta$ 1-42 intracelular induce la apoptosis mediante la activación de caspasa-3 y bax, así como la reducción de los niveles de Bcl-2 y del potencial de la membrana mitocondrial. Estos resultados fueron también demostrados en muestras de tejido muscular humano de una paciente con miopatía GNE y de una donante control. Finalmente, los miocitos de pacientes con miopatía GNE demostraron un estado pro-apoptótico mayor que los miocitos controles en cuanto al potencial de membrana mitocondrial y en cuanto a la expresión de anexina V.

### **2.2. Efectos intracelulares de la inducción de estrés nitrooxidativo por A $\beta$**

Hemos encontrado que la producción de radicales libres se dispara por los oligómeros de A $\beta$ . Hemos estudiado el aumento del calcio en la mitocondria por la

acción de los oligómeros de A $\beta$  y hemos observado que el tratamiento con oligómeros de A $\beta$  induce un aumento del calcio mitocondrial. El papel del calcio en la toxicidad de A $\beta$  es muy importante, considerando que este calcio sería capaz de activar la producción de óxido nítrico por la sintasa de NO mitocondrial. Cuando el estrés oxidativo produce anión superóxido en presencia de NO se genera peroxinitrito, que es el responsable de la nitrotirosinación de proteínas, principalmente de la triosa fosfato isomerasa (TPI), una enzima clave del metabolismo de la glucosa. Hemos estudiado la nitrotirosinación de A $\beta$  y su efecto en la agregación y hemos hallado que estabiliza los oligómeros, las formas más tóxicas. También expresamos de forma estable en miocitos un péptido inerte con un tamaño similar a A $\beta$  (*flit*) y A $\beta$  salvaje, encontrando que las células que expresaron A $\beta$  mostraron una viabilidad significativamente disminuida en comparación con las que expresaron *flit*, demostrándose que es un efecto específico de A $\beta$ .

### **2.3. Efecto sobre la activación de las cinasas que median el estrés intracelularmente y sobre la expresión de BACE1**

Los agregados de A $\beta$  producen estrés nitrooxidativo y en este objetivo hemos estudiado los efectos de dicho estrés sobre la expresión de BACE1 por la activación de las rutas intracelulares JNK y p38 MAP, que son conocidas por ser activadas por estrés celular. Hemos obtenido que A $\beta$  induce la migración nuclear de c-jun y la aparición de células positivas para p38 MAPK. Esta activación produce la transcripción de BACE1 y de su expresión, lo que determina un aumento de la producción de A $\beta$  extracelular. Además hemos estudiado la ruta de supervivencia Akt y hemos encontrado que de forma constitutiva los miocitos de pacientes de miopatía GNE presentaban una inhibición de la fosforilación de Akt, circunstancia que constituye una desprotección frente al daño inducido por A $\beta$ . Por otra parte, se analizó la inactivación de la enzima GSK3- $\beta$  por fosforilación en serina 9. Esta enzima está en el *down-stream* de la activación de Akt, que la fosforila para evitar su activación, que es considerada negativa para las células. En estos experimentos, A $\beta$  disminuyó la fosforilación de GSK3- $\beta$ , lo que significa el impedimento de la

transcripción de genes protectores Tcf-lef por beta-catenina y probablemente el aumento de la traducción de BACE1.

#### **2.4. Estudio de los genes que contribuyen a la supervivencia celular o la toxicidad de A $\beta$ en levaduras**

Hemos sobreexpresado A $\beta$  en levaduras mutadas para identificar los genes que afectan a la toxicidad inducida por el amiloide. Hemos estudiado 6.000 genes y su papel en la supervivencia celular y en la contribución a la toxicidad de A $\beta$ . Tras realizar el estudio experimental, 150 genes fueron significativos para aumentar la supervivencia celular o para contribuir a la toxicidad de A $\beta$ . Los genes más relevantes se citan a continuación agrupados en diferentes funciones y rutas celulares:

- Antioxidantes: SOD1, catalasa y glutatión reductasa (protectores).
- Cadena respiratoria mitocondrial: citocromo C oxidasa (protector).
- Endocitosis: clatrina (aumenta toxicidad) y flipasa (protector).
- Vía de las pentosas-fosfatos: ribulosa 5-p-3-epimerasa (protector).
- Ciclo de Krebs: enzimas implicadas en la producción de citrato, malato y acetil-CoA (protectores).
- Glicólisis: triosa fosfato isomerasa (protector).
- Gluconeogénesis: fosfoenol piruvato carboxilo cinasa (protectora).
- Síntesis de esfingolípidos: ceramidasa IDC1 (aumenta toxicidad).
- Glicosilación: manosil transferasa (protectora).
- Síntesis de proteínas: diftamida sintetasa (aumenta toxicidad).
- Síntesis de folato: tetrahidrofolato sintasa (protector).
- Homeostasis del calcio: ortólogos del SERCA y DIRK-1 de mamíferos (aumentan toxicidad).

Una vez identificadas las posibles dianas para inducir protección frente al daño de A $\beta$  en miocitos, se probaron diferentes compuestos. En primer lugar, y dada la presencia de estrés nitrooxidativo y el papel protector identificado por SOD1, catalasa y glutatión reductasa, se realizaron experimentos de protección con

diferentes antioxidantes (trolox, glutatión reducido y n-acetilcisteína). Sin embargo, no se obtuvieron resultados significativos de protección con estos compuestos. Respecto a la glucólisis y el papel protector de la triosa fosfato isomerasa, sí se realizaron diferentes experimentos, demostrándose que su integridad funcional es fundamental para evitar la toxicidad de A $\beta$ . Finalmente, se ensayó el papel protector de la ruta del folato mediante diferentes compuestos. Obtuvimos protección celular utilizando la vitamina B12, que está íntimamente relacionada con la función del folato y se ha propuesto como neuroprotectora en la enfermedad de Alzheimer, una patología debida también a la agregación de A $\beta$ .

### 3. Relevancia y posibles implicaciones

Los resultados obtenidos permiten, en primer lugar, un mayor conocimiento de esta enfermedad, en la que aunque originalmente se había descrito un aumento de vacuolización de las células musculares esqueléticas con una concomitante presencia de agregados intracelulares de A $\beta$ , no se había establecido cómo la deficiencia en el gen GNE, que impide la sialización de proteínas, inducía la enfermedad.

Con nuestro trabajo se abren las posibilidades de considerar como dianas terapéuticas: 1) la **inhibición de BACE1**, la enzima clave en la producción de amiloide, circunstancia que evitaría la agregación del amiloide intracelular y la consiguiente citotoxicidad; 2) considerando que la toxicidad del amiloide es directamente dependiente de su agregación en oligómeros, sería fundamental el tratamiento con **inhibidores intracelulares de la agregación**; 3) promover la **sialización de las biomoléculas**; 4) la **inhibición de la GSK-3 $\beta$**  sería también fundamental para inducir protección celular; 5) el tratamiento con **fármacos que actúen sobre las rutas relacionadas con los genes identificados** como capaces de aumentar la supervivencia celular; siendo la ruta del folato una de ellas, así como aquellas relacionadas con la modulación del calcio intracelular.

## 4. Bibliografía científica generada

### 4.1. Artículos publicados

Pacheco C, Morales CN, Ramírez AE, Muñoz FJ, Gallegos SS, Caviedes PA, Aguayo L, Opazo C.

*Extracellular  $\alpha$ -synuclein alters synaptic transmission in brain neurons by perforating the neuronal plasma membrane.*

J Neurochem, 132:731-41, 2015

Ill-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernández E, Guix FX, Bosch-Morató M, Guivernau B, Tajés M, Valls-Comamala V, Jiménez-Conde J, Ois A, Pérez-Asensio F, Reyes-Navarro M, Caballo C, Gil-Gómez G, Lopez-Vilchez I, Galan AM, Alameda F, Escolar G, Opazo C, Planas AM, Roquer J, Valverde MA, Muñoz FJ.

*Fibrinogen nitrotyrosination after ischemic stroke impairs thrombolysis and promotes neuronal death.*

Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 1852:421-8, 2015

Vicario-Orrí E, Opazo C, Muñoz FJ.

*The Pathophysiology of Axonal Transport in Alzheimer's Disease.*

J Alzheimers Dis, 43:1097-1113, 2015

Tajés M, Eraso-Pichot A, Rubio-Moscardó F, Guivernau B, Bosch-Morató M, Valls-Comamala V, Muñoz FJ.

*Methylglyoxal reduces mitochondrial potential and activates Bax and caspase-3 in neurons: Implications for Alzheimer's disease.*

Neurosci Lett, 580:78-82, 2014.

Tajés M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, Bosch-Morató M, Guivernau B, Eraso-Pichot A, Salvador B, Fernández-Busquets X, Roquer J, Muñoz FJ.

*The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it.*

Mol Membr Biol, 31:152-67, 2014.

Bellot A, Guivernau B, Tajés M, Bosch-Morató M, Valls-Comamala V, Muñoz FJ.  
*The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines.*

Brain Res, 1573:1-16, 2014.

Tajés M, Eraso-Pichot A, Rubio-Moscardó F, Guivernau B, Ramos-Fernandez E, Bosch-Morató M, Guix FX, Clarimón J, Miscione GP, Boada M, Suzuki T, Molina H, Villà-Freixa J, Vicente R and Muñoz FJ.

*Methylglyoxal produced by amyloid b-peptide-induced nitrotyrosination of triosephosphate isomerase triggers neuronal death in Alzheimer's disease.*

J. Alzheimer Dis, 41:273-88, 2014.

Ramos-Fernandez E, Palomer E, ILL-Raga G, Tajés M, Bosch-Morató M, Guivernau B, Román-Dégano I, Nuñez L, Paez A, Alameda F, Elosúa R, Boada M, Valverde MA, Muñoz FJ.

*Posttranslational nitro-glycative modifications of albumin in Alzheimer's disease: implications in cytotoxicity and amyloid  $\beta$ -peptide aggregation.*

J. Alzheimer Dis, 40:643-57, 2014.

Muñoz FJ, Godoy JA, Cerpa W, Poblete IM, Huidobro-Toro JP, Inestrosa NC.

*Wnt-5a increases NO and modulates NMDA receptor in rat hippocampal neurons.*

Biochem Biophys Res Commun 444:189-94, 2014.

Marín T, Contreras P, Castro JF, Chamorro D, Balboa E, Bosch-Morató M, Muñoz FJ, Alvarez AR, Zanlungo S.

*Vitamin E Dietary Supplementation Improves Neurological Symptoms and Decreases c-Abl/p73 Activation in Niemann-Pick C Mice.*

Nutrients 6:3000-3017, 2014.

Tajés M, ILL-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernandez E, Guix FX, Bosch-Morató M, Guivernau B, Jiménez-Conde J, Ois A, Pérez-Asensio F, Reyes-Navarro M, Caballo C,



Galán AM, Alameda F, Escolar G, Opazo C, Planas A, Roquer J, Valverde MA and Muñoz FJ.

*Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death.*

Oxid. Med. Cell. Longev, 2013:826143, 2013.

Tajes M, Guivernau B, Ramos-Fernández E, Bosch-Morató M, Palomer E, Guix FX, Muñoz FJ.

*The pathophysiology of triose phosphate isomerase dysfunction in Alzheimer's disease.*

Histol Histopathol, 28:43-51, 2013.

Guix FX, Wahle T, Vennekens K, Snellinx A, Chávez-Gutiérrez L, Ill-Raga G, Ramos-Fernandez E, Guardia-Laguarta C, Lleó A, Arimon M, Berezovska O, Muñoz FJ, Dotti CG, De Strooper B.

*Modification of gamma-secretase by nitrosative stress links neuronal ageing to sporadic Alzheimer's disease.*

EMBO Mol Med, 4:660-73, 2012.

#### **4.2. Artículos en preparación**

Increased amyloid  $\beta$ -peptide uptake due to hyposialylation induces apoptosis in GNE Myopathy.

Identification of modulators of A $\beta$ 1-42 toxicity by genome-wide analysis of *Saccharomyces cerevisiae*

#### **4.3. Comunicaciones a congresos**

**4 comunicaciones** a BBVA Foundation-IRB Barcelona. Barcelona Biomed

Conferences:

Amyloid-® and Alzheimer's Disease: From Fundamental Principles to Therapeutic Strategies.

Barcelona. Julio 2014.

**4 comunicaciones** a 3rd IRB Barcelona PhD Student Symposium.

The Clock of Life: cellular and molecular processes of development, ageing and disease.

Barcelona. Noviembre 2013.

**2 comunicaciones** a The 8th International Congress on Vascular Dementia, Atenas (Grecia). Octubre 2013.

**3 comunicaciones** a The 11th international conference on Alzheimer's and Parkinson's disease. Florencia (Italia). Marzo 2013.

**1 comunicación** a Chilean Society for Cell Biology - XXVI Annual Meeting, Puerto Varas (Chile). Octubre 2012.

**2 comunicaciones** a Basic and Clinical Research: Present and Future of Alzheimer's Research. Madrid. Septiembre, 2011.

**2 comunicaciones** a International Bunsen Discussion Meeting on "Structure of Amyloid Fibrils and Mechanism of Amyloid Formation". Halle (Alemania). Agosto 2011.