



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Consorcio de Investigación Integrativa de la Ataxia de Friedreich (FAIR): aproximación fisiopatológica y terapéutica

Dr. Francesc Palau Martínez

CIBER Centro de Investigación Biomédica en Red.
Institut de Biomedicina de València CSIC

Dr. Enric Querol Murillo

Institut de Biotecnologia i Biomedicina UAB

Dra. Maria Dolores Moltó Ruiz

Facultat de Ciències Biològiques UV

Dr. Jordi Tamarit Sumalla

Facultat de Medicina UdL





1. Resumen

Desde la identificación de *FXN* como el gen mutante responsable de la ataxia de Friedreich (FRDA, OMIM #229300, ORPHA95) y de la proteína que codifica, frataxina, se ha hecho un gran trabajo para entender la función de la frataxina y la fisiopatología de la enfermedad. El principal objetivo de este proyecto ha sido analizar las consecuencias de la deficiencia de frataxina para intentar descubrir los principales procesos celulares afectados, utilizando tanto diversos modelos biológicos como herramientas bioinformáticas. El conocimiento generado por estas aproximaciones complementarias ha sido la base para la búsqueda y validación de nuevos biomarcadores que puedan eventualmente ser útiles para el diagnóstico, el seguimiento clínico y los ensayos clínicos.

Para alcanzar este objetivo general se creó un Consorcio de Investigación Integrativa de la Ataxia de Friedreich (FAIR en su sigla en inglés). El Consorcio FAIR, formado por cuatro grupos de investigación, ha abordado esta cuestión mediante cuatro paquetes de trabajo: fisiopatología celular, función de la frataxina, genes modificadores y biomarcadores, y cribado de fármacos.

2. Resultados

El conocimiento acerca de la función molecular de esta proteína se ha obtenido gracias al uso de modelos animales y celulares. Sin embargo, la investigación en células primarias de los tejidos u órganos principalmente afectados es estrictamente necesaria. Nosotros propusimos la utilización tanto de cultivos de líneas celulares (cardiomiocitos, células de neuroblastoma SH-SY5Y similares a neuronas), cultivos de células primarias del ganglio de la raíz dorsal (GRD), o de la mosca *Drosophila melanogaster*, para comprender los efectos fisiopatológicos del déficit de frataxina. Además, realizamos una aproximación global de las rutas

moleculares afectadas en la bioquímica y la biología de la frataxina que permitieran la definición de nuevas dianas farmacológicas para la terapia de esta enfermedad.

Paquete de trabajo 1. Fisiopatología celular

En los laboratorios de los grupos de la Universitat de Lleida y del Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC) hemos trabajado con modelos celulares en los que se ha silenciado la expresión del gen *FXN*, bien en cultivo primario de células diana cardíacas o neuronales, bien en modelos de líneas establecidas de neuroblastoma humano SH-SY5Y. También hemos estudiado los efectos del déficit de frataxina en el modelo murino de FRDA, el ratón YG8R.

Desarrollamos nuevos modelos celulares a partir de cultivos primarios de cardiomiocitos y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) procedente de ratas neonatales. La expresión de frataxina en estas células se interfirió utilizando shRNA transducido mediante partículas lentivirales. La interferencia fue verificada por Western-blot y RT-PCR cuantitativa. La disminución de la expresión de frataxina en cardiomiocitos comportaba una clara alteración en el patrón de distribución de la red mitocondrial, una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y una mayor presencia de proteínas oxidadas. También se observó una clara alteración en el metabolismo lipídico, situación que conduce a la acumulación de gotas lipídicas en los cardiomiocitos deficientes en frataxina. Por otra parte, los estudios metabolómicos han permitido determinar que los cardiomiocitos deficientes en frataxina presentan alteraciones metabólicas claras y se han identificado algunos compuestos potencialmente alterados. Un análisis proteómico también ha permitido identificar varias proteínas alteradas. Estas dianas se encuentran en la actualidad en fase de validación mediante proteómica dirigida. Por lo que respecta a las neuronas de los GRD, se ha podido comprobar un descenso notable en la supervivencia a los 5 días de la interferencia de frataxina. Esta muerte es de tipo apoptótica. Además se observa la presencia de

engrosamientos en las neuritas que podrían estar relacionados con una alteración del citoesqueleto. La viabilidad celular, puede recuperarse mediante el tratamiento con el péptido antiapoptótico TAT-BH4, abriendo la puerta a otra vía terapéutica que permita mejorar los síntomas neurológicos de los pacientes de ataxia de Friedreich. Otro aspecto interesante es la relación de frataxina con el metabolismo del calcio, ya que en este modelo celular también se ha podido observar una alteración marcada en los niveles de este ión y que quelantes de calcio pueden tener un efecto beneficioso sobre la viabilidad celular.

Se llevó a cabo el desarrollo y caracterización funcional de un modelo crónico de la enfermedad con la tecnología de RNA de interferencia, generando líneas estables deficientes para frataxina en una línea neuronal humana de neuroblastoma (SH-SY5Y). Hemos investigado las consecuencias celulares y mitocondriales de la falta de frataxina en este modelo neuronal y en neuronas sensitivas del ganglio dorsal de un ratón modelo de la enfermedad (YG8R). En la línea celular humana de neuroblastoma, el déficit de frataxina provoca un crecimiento más lento asociado a senescencia celular. Hemos demostrado que la reducción de frataxina induce una disfunción mitocondrial debido a un déficit bioenergético y a un incorrecto metabolismo del Ca^{2+} en la mitocondria, que se asocia a un estrés de retículo y estrés oxidativo. Además, la depleción de frataxina no causa muerte celular, aunque sí incrementa la autofagia, que podría tener un efecto citoprotector frente a un daño como el estrés oxidativo. Los estudios en cultivo primario de GRD han mostrado una alteración del citoesqueleto, observándose la formación de unas estructuras anormales, asociadas a neurodegeneración, en los axones de las neuronas (*beadings*). Esto podría deberse a una alteración del metabolismo del Ca^{2+} , confirmado de nuevo en este modelo neuronal.

Se realizó un estudio de rutas asociadas con neurodegeneración que podrían estar involucradas en la fisiopatología de la ataxia de Friedreich. Para ello se investigó la expresión de proteínas relacionadas con estrés oxidativo, apoptosis, autofagia y

metabolismo energético, en diferentes tejidos del ratón YG8R: ganglio dorsal, raíces nerviosas, columnas posteriores y tronco del encéfalo. Observamos que las raíces nerviosas y el GRD están más afectados que otros tejidos neuronales. Ello sugiere que la axonopatía podría ser un defecto primario en el ratón YG8R, siendo la degeneración del GRD y las columnas posteriores la consecuencia de un proceso neuropático de *dying-back*.

Paquete de trabajo 2. Función de la frataxina

Para entender los mecanismos que llevan a la acumulación de hierro en ausencia de frataxina y definir el papel de esta proteína en el metabolismo del hierro, en el laboratorio de la Universitat de Lleida se trabajó con un modelo de levadura deficiente en frataxina. Se utilizaron cepas en que la expresión de la frataxina de levadura (YFH1) se encontraba bajo el control de promotores Tet, reprimibles por la adición de doxiciclina al medio de cultivo. El análisis proteómico de estos mutantes tras la represión de YFH1 nos reveló la disminución del contenido de Adh2 y Ald4. Dado que estas dos proteínas están bajo el control regulador transcripcional ADR1, se llevó a cabo un estudio transcriptómico, observándose que muchos otros genes dependientes de ADR1 se encontraban reprimidos. El marcaje de ADR1 con proteína GFP permitió descubrir que la localización celular de ADR1 cambia después de la represión de YFH1. Asimismo, el análisis transcriptómico permitió observar que varios genes del regulón del hierro se encontraban inducidos, circunstancia que explicaría la acumulación de hierro en los mutantes deficientes en YFH1. Esto nos llevó a estudiar el papel de Cth2, un miembro del regulón del hierro que provoca una remodelación metabólica mediante la disminución del contenido de varias proteínas dependientes de hierro. El análisis de mutantes deficientes en Cth2 permitió comprobar que esta proteína es la responsable de la disminución del contenido y actividad de aconitasa, succinato deshidrogenasa y citocromo C en ausencia de YFH1. Este proceso explicaría la deficiencia de proteínas con centros hierro-azufre (ISC en su sigla inglesa) observada en ausencia de frataxina.

Para obtener una mayor comprensión de la relación entre función y estructura de la proteína frataxina, utilizando herramientas informáticas se localizaron otras proteínas que interaccionan con frataxina. Se diseñó el algoritmo *DockAnalyse*, aplicado al modelado del complejo en que participa frataxina y sus proteínas *partner*, para proponer la dinámica de formación de los ISC en el mencionado complejo. También hemos estudiado la relación de frataxina con proteínas *moonlighting*, debido a las múltiples funciones que le han sido propuestas hasta ahora. Además, se ha mejorado en varios aspectos la herramienta bioinformática para el análisis de redes de expresión génica desarrollada en el laboratorio de la Universitat Autònoma de Barcelona. También hemos identificado diferentes genes candidatos a ser estudiados en profundidad y hemos propuesto diferentes sustancias a testar en los organismos modelos de que disponen los otros grupos del proyecto.

Paquete de trabajo 3. Genes modificadores

Utilizando un modelo de ataxia de Friedreich en *Drosophila* obtenido en el laboratorio de la Universitat de València, hemos buscado genes modificadores de los fenotipos de pérdida de función de frataxina. Las moscas modelos tienen reducida de forma significativa la supervivencia y las capacidades motoras, presentan acúmulo de Fe mitocondrial y son muy sensibles al estrés oxidativo. Estos fenotipos se han descrito en otros modelos de FRDA y muestran gran similitud con la clínica de los pacientes. Mediante rastreo de genes candidatos hemos identificado modificadores que recuperan parcial o totalmente la capacidad de escalada de las moscas deficitarias en frataxina. Estos modificadores se agrupan en dos tipos funcionales: (1) genes implicados en el metabolismo de los metales; (2) componentes de la ruta bioquímica TOR (*target of rapamycin*), vía de señalización conservada en la evolución e implicada en procesos que permiten el control de la homeostasis celular en respuesta a su entorno. En concreto, la reducción de la expresión de genes que codifican para transportadores de Fe, Cu y Zn mejora las habilidades motoras de las moscas. La reducción de la actividad del

complejo 1 de TOR (TORC1) tiene un efecto beneficioso en el modelo, mejorando significativamente su capacidad de escalada y supervivencia. Este resultado ha sido clave para incluir el compuesto rapamicina en el conjunto de fármacos ensayados, dado que rapamicina es un inhibidor químico de TORC1. Como era de esperar, los tratamientos con rapamicina mejoran los fenotipos de las moscas modelos y hemos identificado que este efecto beneficioso se debe a que proporciona una mayor protección frente al estrés oxidativo generado por la deficiencia de frataxina. Esta mayor protección se obtiene a través del factor de transcripción Cnc, cuya translocación al núcleo aumenta tras los tratamientos con rapamicina y con ello la expresión de una batería de genes antioxidantes regulados por Cnc. Como resultado de ello, varios marcadores bioquímicos de estrés oxidativo recuperan su nivel normal. Además, cuando las moscas modelos se someten a agentes oxidantes externos, rapamicina induce el proceso de autofagia como mecanismo de control de los niveles de estrés oxidativo y de esta forma pueden recuperarse actividades enzimáticas clave para la célula, como la actividad aconitasa, la cual está disminuida en los pacientes de FRDA.

Paquete de trabajo 4. Biomarcadores y cribado de fármacos

El análisis del proteoma bajo condiciones patológicas por déficit de frataxina se ha llevado a cabo en tres modelos en los laboratorios de la Universitat de València y del Instituto de Biomedicina de Valencia: *Drosophila*, modelo celular de neuroblastoma y en el tejido de ganglio dorsal del ratón YG8R. El estudio en *Drosophila* ha permitido la identificación de un total de 69 proteínas que se expresan de forma diferencial en las moscas modelos en comparación con las moscas controles, tanto en condiciones normales de cultivo como sometidas a un fuerte estrés oxidativo. Estas proteínas están involucradas en la fosforilación oxidativa, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, glucólisis/gluconeogénesis, metabolismo de los ácidos grasos, proteasoma y homeostasis del Fe. Esto nos indica que la deficiencia de frataxina va acompañada de alteraciones en un importante número de rutas metabólicas. En el modelo crónico de neuroblastoma

se identificaron 35 proteínas relacionadas con el procesamiento proteico en retículo endoplásmico, regulación de la autofagia, regulación del citoesqueleto de actina, rutas de señalización de calcio, fosforilación oxidativa y ciclo celular, respaldando muchos de los resultados descritos previamente. Finalmente, en el estudio del perfil de proteínas del ganglio dorsal del ratón YG8R con respecto al ratón control C57BL/6J, se han identificado 329 proteínas. Algunas de estas rutas son: proteólisis mediada por ubiquitinación, formación del proteosoma, procesamiento proteico en retículo endoplásmico, regulación de la autofagia, regulación del citoesqueleto de actina, rutas de señalización de calcio, fosforilación oxidativa, guía de axones y ruta de señalización de la insulina. Esto nos indica que la deficiencia de frataxina va acompañada de alteraciones en un importante número de rutas metabólicas y que muchas de ellas son compartidas por los diferentes modelos.

Utilizando el modelo de ataxia de Friedreich en *Drosophila*, hemos ensayado el efecto de 25 fármacos sobre tales fenotipos y hemos analizado el efecto del estrés oxidativo en el conjunto de proteínas o proteoma. Los 25 compuestos que han sido ensayados corresponden a moléculas ya probadas en humanos, fácilmente disponibles en el mercado y cuyo mecanismo de acción podría ser razonablemente útil para el tratamiento de la FRDA. Entre ellos, hemos observado que un quelante de Cu y otro compuesto inhibidor de la actividad TORC1 permiten que las moscas modelos alcancen las capacidades de escalada de los individuos controles. Para el análisis de compuestos farmacológicos en cultivo de neuronas de GRD, nos decantamos por estudiar fármacos que modularan los niveles de calcio, ya que habíamos observado en este modelo un incorrecto tamponamiento del calcio. Se realizó un estudio de la actividad calpaína, observando que el déficit de frataxina conlleva un defecto en la actividad de la calpaína que está directamente relacionado con la cantidad de frataxina presente en la célula. Tras el tratamiento con quelantes de calcio (EGTA y BAPTA) o inhibidores (o-fenantrolina) se observó una disminución en la actividad de la calpaína en el

genotipo C57BL/6J (mayor cantidad de frataxina), mientras que esta diferencia es muy leve en el ratón mutante YG8R.

3. Relevancia y posibles implicaciones

Nuestras investigaciones bioinformáticas y los resultados obtenidos en nuestros modelos biológicos de trabajo han ayudado no solo en la comprensión de la función y las propiedades moleculares de frataxina y las proteínas con las que interacciona, sino también a incrementar el conocimiento global de la patología molecular de esta enfermedad.

Uno de los objetivos del trabajo era definir nuevas herramientas que faciliten el diagnóstico y/o seguimiento evolutivo de los tratamientos en la ataxia de Friedreich. Para ello, planteamos la búsqueda de biomarcadores asociados al déficit de frataxina a través de un análisis proteómico y metabolómico. La identificación de un perfil proteómico en diferentes modelos deficientes para la enfermedad de ataxia de Friedreich, ha permitido confirmar procesos biológicos que previamente habían sido asociados al déficit de frataxina y otros que hasta la fecha no se habían relacionado. Estos hallazgos incrementan el número de procesos y rutas metabólicas en las que podría estar involucrada la frataxina, y que permitirán realizar estudios más profundos en nuestros modelos, para entender mejor la fisiopatología de la enfermedad. La confirmación definitiva de estos “candidatos” a biomarcadores requiere de un rastreo en un elevado número de muestras de pacientes y en distintos estadios de la enfermedad.

El desarrollo de modelos celulares basados en los tejidos más afectados en la patología estudiada (corazón y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal) y el modelo de la mosca *Drosophila* permiten ensayar las posibilidades de revertir las consecuencias de la falta de frataxina que pueden tener múltiples compuestos

potencialmente terapéuticos. Nuestro trabajo ha permitido identificar como posibles compuestos beneficiosos a los quelantes de Cu y a los inhibidores de TORC1, en concreto la rapamicina. Además, identificamos la ruta mTOR como una nueva vía bioquímica asociada a la deficiencia de frataxina, constituyendo una nueva diana terapéutica. Asimismo, los mecanismos descritos en este proyecto merecen ser tenidos en cuenta para su exploración como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de pacientes FRDA, como la manipulación de la homeostasis del Ca²⁺ y el metabolismo lipídico, que deberían ser exploradas como posibles estrategias de tratamiento. Finalmente, las herramientas desarrolladas en nuestro grupo de bioinformática para el análisis de redes de expresión génica y el uso de otras herramientas bioinformáticas existentes han permitido identificar una serie de compuestos potencialmente útiles como fármacos candidatos para la ataxia de Friedreich.

4. Bibliografía científica generada (2010-2015)

Amela I, Delicado P, Gómez A, Bonàs S, Querol E, Cedano J.

DockAnalyse: an application for the analysis of protein-protein interactions.

BMC Struct Biol 2010, 10:37.

Navarro JA, Llorens JV, Soriano S, Botella JA, Schneuwly S, Martínez-Sebastián MJ, Moltó MD.

Overexpression of human and fly frataxins in Drosophila provokes deleterious effects at biochemical, physiological and developmental levels.

PLoS One 2011; 6: e21017.

Hernández S, Amela I, Cedano J, Piñol J, Perez-Pons JA, Mozo-Villarias A, Querol E.

Do Moonlighting Proteins Belong to the intrinsically Disordered Protein Class?

J Proteomics Bioinformatics 2012; 5: 262264.

Amela I, Delicado P, Gómez A, Querol E, Cedano J.

A dynamic model of the proteins that form the initial iron-sulfur cluster biogenesis machinery in yeast mitochondria.

Protein J 2013, 2: 183-196.

González-Cabo P, Palau F.

Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia.

J Neurochem 2013; 126 Suppl. 1: 53-64.

Moreno-Cermeño A, Alsina D, Cabisco E, Tamarit J, Ros J.

Metabolic remodeling in frataxin-deficient yeast is mediated by Cth2 and Adr1.

Biochim Biophys Acta 2013; 1833: 3326-37.

Soriano S, Llorens JV, Sobero LB, Gutiérrez L, Calap-Quintana P, Morales MP, Moltó MD, Martínez-Sebastián MJ.

Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a Drosophila model of Friedreich's ataxia.

Gene 2013; 521: 274-281

Bolinches-Amorós A, Mollá B, Pla-Martín D, Palau F, Gonzalez-Cabo P.

Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism.

Front Cell Neurosci 2014; 8: 124.

Hernández S, Calvo A, Ferragut G, Franco L, Hermoso A, Amela I, Gómez A, Querol E, Cedano J.

Can bioinformatics help in the identification of moonlighting proteins?

Biochem Soc Trans 2014; 42: 1692-1697.

Hernández S, Ferragut G, Amela I, Perez-Pons JA, Pinol J, Mozo-Villarias A, Cedano J, Querol E.

MultitaskProtDB: a database of multitasking proteins.

Nucleic Acids Res 2014; 42: D517-520.

Mincheva-Tasheva S, Obis E, Tamarit J, Ros J.

Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein.

Hum Mol Genet 2014 23: 1829-41

Obis E, Irazusta V, Sanchís D, Ros J, Tamarit J.

Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism.

Free Radic Biol Med 2014; 71: 21-33.

González-Cabo P, Vázquez-Manrique R.

C. elegans models to study the molecular biology of ataxias. In: **Movement Disorders: Genetics and Models**, Second Edition. Ed. Mark S. LeDoux. I, pp. 1043-1059, 2015 (ISBN 978-0-12-405195-9).

Calap-Quintana P, Soriano S, Llorens JV, Botas J, Moltó MD, Martínez-Sebastián MJ.

TORC1 inhibition by rapamycin decreases oxidative stress promoting antioxidant defenses in a Drosophila model of Friedreich's ataxia.

PLoS One 2015 (en revisión)