



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora: bases fisiopatológicas de la enfermedad y aproximaciones terapéuticas

Dr. Pascual Sanz Bigorra

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER, e Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Valencia.
Coordinador del proyecto.

Dr. Erwin Knecht Roberto

Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia

Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid





1. Objetivo del proyecto

La enfermedad de Lafora es un desorden neurodegenerativo grave, de herencia autosómica recesiva, causado por mutaciones en el gen EPM2A, que codifica para la fosfatasa de tipo dual laforina, y el gen EPM2B, que codifica para la E3-ubiquitina ligasa malina. Estas proteínas forman un complejo funcional que regula la síntesis de glicógeno y posiblemente otros importantes procesos celulares, como proliferación celular, apoptosis, estrés por retículo endoplásmico, metabolismo energético y diferenciación. El principal objetivo del presente proyecto es obtener información sobre las funciones fisiológicas de la laforina y la malina, así como identificar posibles dianas de intervención terapéutica. Para ello se han utilizado modelos celulares y animales de la enfermedad.

Qué se ha descubierto

En la enfermedad de Lafora existe una disfunción de la regulación de la proteólisis intracelular, fundamentalmente mediada por autofagia. Hemos demostrado la participación de diferentes componentes que median en esta acción, como la E2-conjugasa UBE2N y la proteína cinasa p38. También hemos observado alteraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma, endocitosis y la disfunción mitocondrial (con aumento del estrés oxidativo), que entendemos que podrían ser secundarias al defecto en autofagia.

Estos resultados identifican la homeostasis proteica intracelular (plegamiento de proteínas y proteólisis intracelular: proteostasis) como una diana de acción farmacológica. En este sentido se han probado compuestos que mejoran la proteólisis intracelular (por aumento de la actividad autofágica [tratamiento con rapamicina y trehalosa]) o el plegamiento de proteínas (mediante chaperonas químicas [4-fenilbutirato]) o se han usado activadores de la proteína cinasa AMPK (sensor energético celular con propiedades neuroprotectoras) (metformina), como

candidatos para mejorar los síntomas neurológicos presentes en modelos animales de la enfermedad. Nuestros resultados indican que solo en el caso del tratamiento con 4-fenilbutirato o metformina se observó una mejora en las alteraciones neurológicas de estos ratones modelo.

Aplicación práctica

Nuestros resultados indican que la mejora de las condiciones de homeostasis proteica intracelular (proteostasis) tiene un efecto beneficioso sobre los síntomas neurológicos que acompañan a la enfermedad. Dado que los compuestos activos encontrados (4-fenilbutirato y metformina) se usan ya en el tratamiento de otras enfermedades más comunes, su uso en la clínica de la enfermedad de Lafora puede ser inmediato. Paralelamente, estos compuestos podrían ser el punto de partida en la síntesis de compuestos más potentes.

2. Resultados

1) Bases moleculares de la enfermedad de Lafora: mecanismo de acción del complejo laforina-malina

Resultados anteriores del grupo indicaban que laforina y malina forman un complejo funcional con actividad E3-ubiquitina ligasa. En este proyecto demostramos que para que el complejo ejerza su función, necesita unirse a un tipo especial de E2-conjugasa, denominada UBE2N. La unión a esta enzima determina el tipo de topología de las cadenas de ubiquitina que genera el complejo laforina-malina, siendo las mayoritarias las que contienen ubiquitinas enlazadas por uniones entre los residuos de lisina en la posición 63 de la molécula de ubiquitina (uniones K63).

También hemos observado que la laforina es capaz de dimerizar, participando el residuo Cys329 (localizado en el extremo C-terminal) en este proceso.

Adicionalmente hemos observado que la actividad fosfatasa de la laforina no es necesaria para que el complejo laforina-malina sea funcional. Estos resultados sugieren que la laforina tendría un papel de reconocimiento de sustratos en el que su actividad fosfatasa no sería necesaria. Los sustratos así reconocidos serían modificados por la actividad E3-ubiquitina ligasa de la malina.

2) Alteraciones patológicas en la enfermedad de Lafora

2.1) Alteraciones en la homeostasis de las proteínas celulares (proteostasis): la enfermedad de Lafora se caracteriza por la acumulación de poliglucosanos (formas de glucógeno poco ramificado) en neuronas y otros tipos celulares en tejidos periféricos. Nuestro grupo ha demostrado que el complejo laforina-malina, además de participar en la regulación de la síntesis de glucógeno, participa en la regulación de un conjunto de procesos celulares encaminados a mantener la homeostasis proteica celular (proteostasis). Así, en modelos celulares y animales de la enfermedad hemos demostrado que el recambio de proteínas mal plegadas está dañado por una disminución tanto de la actividad de los proteasomas como por un déficit de la actividad autofágica. Como resultado de estas alteraciones, se dispara la respuesta a proteínas mal plegadas, aumentando así la sensibilidad celular en condiciones de estrés por retículo endoplásmico.

Como consecuencia de la deficiencia en la ruta autofágica, otras rutas relacionadas con este proceso también se encuentran alteradas en modelos celulares y animales de la enfermedad. Así, encontramos deficiencias tanto en la endocitosis de fase fluida como en la endocitosis mediada por receptor.

2.2) Alteraciones en la regulación del estrés oxidativo: como consecuencia de los daños descritos en el apartado anterior, la funcionalidad mitocondrial se encuentra también dañada en los modelos celulares y animales de la enfermedad, lo que produce un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas alteraciones, unidas a que la actividad de algunas de las enzimas que participan en la detoxificación de estas especies reactivas se encuentra

disminuida en los modelos de la enfermedad, originan como consecuencia el establecimiento de unas condiciones de estrés oxidativo, que si se mantienen pueden dar lugar a la muerte celular.

2.3) Alteraciones en la plasticidad neuronal: estudiando las neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo, hemos observado que existen diferencias en la organización de las dendritas en ratones modelos de la enfermedad. También hemos encontrado una mayor excitabilidad neuronal en el cerebro de ratones modelos de la enfermedad, que podría explicarse por la aberrante organización dendrítica presente. Esta mayor excitabilidad no es debida a diferencias en la transmisión mediada por la relación AMPAR/GABAR, que es similar a la que presentan los ratones controles. Sin embargo, los modelos de la enfermedad presentaron segmentos axonales iniciales (AIS) más largos, lo que confirma su aumentada excitabilidad.

3) Aproximaciones terapéuticas en la enfermedad de Lafora

3.1) Aumento de la actividad autofágica: dado que, tal como se ha descrito en el apartado anterior, en los modelos celulares y animales de la enfermedad existía un déficit en la degradación de proteínas por la ruta autofágica-lisosomal, sometimos modelos animales de la enfermedad de Lafora a un tratamiento combinado con temsirolimus (un análogo de la rapamicina, con capacidad de inhibición de la ruta mTOR [un regulador negativo de la autofagia]) y trehalosa (un activador de la ruta autofágica por un mecanismo independiente de mTOR), para así aumentar la autofagia. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento ejerció el efecto inhibitor esperado sobre la ruta mTOR, no observamos ningún beneficio en los modelos animales: tanto los marcadores neurológicos (número de cuerpos de Lafora, gliosis reactiva) como las pruebas de comportamiento a que fueron sometidos los ratones tratados, no mostraron ningún cambio respecto a los ratones no tratados.

3.2) Mejora de las condiciones de proteostasis celular: otra aproximación que se siguió fue la de tratar los animales modelos de la enfermedad con compuestos que mejoraran la proteostasis celular, que, como se ha descrito en el apartado anterior, se encontraba alterada. Decidimos utilizar una chaperona molecular (4-fenilbutirato) y un activador de la proteína cinasa AMPK, un regulador energético celular con propiedades neuroprotectoras (metformina).

Observamos que tras el tratamiento durante dos meses a ratones modelos de la enfermedad con estos compuestos, el número de cuerpos de Lafora que aparecían en cortes histológicos de diferentes áreas del cerebro era menor. Además, existía una menor pérdida neuronal y una menor gliosis reactiva. Finalmente, el tratamiento con cualquiera de estos dos compuestos mejoraba las pruebas de comportamiento de los ratones tratados.

3. Relevancia y posibles implicaciones

La epilepsia mioclónica progresiva de tipo Lafora es una alteración neurológica caracterizada por neurodegeneración, epilepsia y acúmulo de poliglucosanos (cuerpos de Lafora) en el cerebro de los pacientes. Se ha descrito que las dos proteínas cuyas alteraciones causan la enfermedad (laforina y malina) forman un complejo funcional que regula la síntesis de glucógeno en las neuronas y en otros tejidos. En ausencia de un complejo funcional, la síntesis de glucógeno se ve aumentada, originando la aparición de los acúmulos de poliglucosanos característicos de la enfermedad. Sin embargo, todavía persiste la duda de si el acúmulo de cuerpos de Lafora es patológico por sí mismo, o si el factor determinante de la patología de la enfermedad reside en otras rutas celulares. Los resultados obtenidos durante este proyecto indican que el complejo laforina-malina participa en la homeostasis proteica celular (proteostasis), regulando procesos clave como la respuesta a proteínas mal plegadas y la proteólisis intracelular mediada por proteasomas y autofagia. Por tanto, nuestros resultados

han permitido definir diferentes dianas terapéuticas alternativas al proceso de regulación de síntesis de glucógeno. También hemos diseñado y ensayado diferentes estrategias con el fin de mejorar la funcionalidad de dichas dianas relacionadas con la proteostasis, encontrándose que la mejora de este proceso celular conduce a una mejoría tanto en los parámetros neuronales como en las pruebas de comportamiento de ratones modelos de la enfermedad tratados. Por tanto, el restablecimiento de la proteostasis celular emerge como una diana a tener en cuenta en el desarrollo de posibles tratamientos de la enfermedad.

Además, ya que los compuestos utilizados en estas pruebas (4-fenilbutirato y metformina) se utilizan habitualmente en la clínica diaria para el tratamiento de otras enfermedades más comunes, su uso en enfermos de Lafora podría ser inmediato.

Estos compuestos también podrían ser el punto de partida en el diseño de nuevos productos más potentes. Además, se podría pensar en un tratamiento combinado e incluso en la introducción de compuestos antioxidantes con el fin de mejorar cada una de las dianas terapéuticas que hemos definido durante la realización del presente trabajo.

4. Bibliografía científica generada

Criado, O., Aguado, C., Gayarre, J., Duran-Trio, L., Garcia-Cabrero, A.M., Vernia, S., San Millan, B., Heredia, M., Romá-Mateo, C., Mouron, S., Dominguez, M., Navarro, C., Serratosa, J.M., Sanchez, M., Sanz, P., Bovolenta, P., Knecht, E. and Rodriguez de Cordoba, S.

Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlates with impaired autophagy.

Hum. Mol. Genet. 21, 1521-1533 (2012).

Knecht, E., Criado, O., Aguado, C., Gayarre, J., Duran, L., Garcia-Cabrero, A.M., Vernia, S., San Millán, B., Heredia, M., Romá-Mateo, C., Mouron, S., Juana-López, L., Domínguez, M., Navarro, C., Serratos, J.M., Sanchez, M., Sanz, P., Bovolenta, P. and Rodriguez de Cordoba, S.

Malin knockout mice support a primary role of autophagy in the pathogenesis of Lafora disease.

Autophagy, 8, 701-703 (2012).

Garcia-Cabrero, AM., Marinas, A., Guerrero, R., Rodriguez de Córdoba, S., Serratos, JM. And Sanchez, M.P.

Laforin and malin deletions in mice produce similar neurologic impairments.

J. Neuropathology Exp. Neurol. 71: 413-421 (2012).

Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E.

Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β).

J. Biol Chem. 287, 38625-38636. (2012).

Romá-Mateo, C., Sanz, P*, Gentry, M.S.

Deciphering the role of malin in the Lafora progressive myoclonus epilepsy.

IUBMB Life, 64, 801-808 (2012).

Gentry, M.S., Romá-Mateo, C., Sanz, P.

Laforin, a protein with many faces: glucan phosphatase, adaptor protein, et alii.

FEBS Journal, 280, 525-537 (2013).

Moruno-Manchón JF, Pérez-Jiménez E, Knecht E.

Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway.

Biochem. J. 449:497-506 (2013).

Sanchez-Martin, P., Raththagala, M., Bridges, T.M., Husodo, S., Gentry, M.S., Sanz, P. and Romá-Mateo, C.

Dimerization of the glucan phosphatase laforin requires the participation of cysteine
329. PLoS One 8: e69523 (2013).

Rubio-Villena, C., Garcia-Gimeno, M.A. and Sanz, P.

Glycogenic activity of R6, a protein phosphatase 1 regulatory subunit, is modulated by the laforin-malin complex.

Int. J. Biochem. Cell Biol. 45: 1479-1488 (2013).

Gayarre J, Duran-Trío L, Criado Garcia O, Aguado C, Juana-López L, Crespo I, Knecht E, Bovolenta P, Rodríguez de Córdoba S. *The phosphatase activity of laforin is dispensable to rescue Epm2a^{-/-} mice from Lafora disease.*

Brain 137:806-818 (2014).

Romá-Mateo, C., Aguado, C., Garcia-Gimenez, J.L., Ibañez-Cabellos, S., Seco-Cervera, M., Pallardó, F.V., Knecht, E. and Sanz, P.

Increased oxidative stress and impairment of antioxidant systems in Lafora disease models.

Mol Neurobiol. PMID: 24838580 (2015).

Romá-Mateo, C., Aguado, C., Garcia-Gimenez, J.L., Knecht, E., Sanz, P., Pallardó, F.V.

Oxidative stress, a new hallmark in the pathophysiology of Lafora progressive myoclonus epilepsy.

Free Rad. Biol. Med. PMID: 25680286 (2015).

Berthier, A., Payá, M., Garcia-Cabrero, A.M., Ballester, M.I., Heredia, M., Serratosa, J.M., Sanchez, M.P., Sanz, P.

Pharmacological interventions to ameliorate neuropathological symptoms in a mouse model of Lafora disease.

Mol. Neurobiol, PMID: 25627694 (2015).