

MITOCURE

Centro  
Andaluz  
de Biología  
del Desarrollo



## **MITOCURE:**

**NUEVAS DIANAS TERAPEUTICAS PERSONALIZADAS  
EN LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES**



Investigador Principal: **José Antonio Sánchez Alcázar**  
CABD-CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain.  
e-mail: [jasanalc@upo.es](mailto:jasanalc@upo.es)  
Teléfono: 954978071

## **Resumen**

Las enfermedades mitocondriales abarcan un amplio espectro de trastornos musculares y neurodegenerativos, crónicos y progresivos, causadas por mutaciones en el ADN nuclear (nDNA) o mitocondrial (mtDNA), la mayoría de las cuales no tienen tratamiento eficaz.

Las terapias farmacológicas actuales se basan fundamentalmente en: 1) Eliminar los metabolitos tóxicos; 2) Intentar circunvalar los bloqueos de la cadena respiratoria; 3) Administrar metabolitos y cofactores para mejorar la síntesis de ATP; 4) Prevenir el estrés oxidativo.

En este proyecto proponemos evaluar la efectividad terapéutica de los distintos tratamientos disponibles en los fibroblastos derivados de los pacientes mitocondriales 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 estudiaremos la proliferación celular, las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial, los niveles de coenzima Q<sub>10</sub>, 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.

## Introducción

Las enfermedades mitocondriales abarcan un amplio espectro de trastornos musculares y neurodegenerativos, crónicos y progresivos, causadas por mutaciones en el ADN nuclear (nDNA) o mitocondrial (mtDNA) [1]. Entre las mutaciones patogénicas del mtDNA, más del 50% se han identificado en los genes que codifican por los ARN de transferencia mitocondriales (mt-tRNA) (genes MTT). La progresión de estas enfermedades es frecuentemente dramática y los pacientes experimentan un progresivo deterioro neurológico y neuromuscular que resulta en demencia, invalidez y muerte repentina, a menudo en la infancia. Dada la alta morbilidad y mortalidad de las enfermedades mitocondriales es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos capaces de mejorar el pronóstico de estas patologías.

Para entender las bases moleculares y celulares de las enfermedades y, sobre todo, para identificar los genes correctores o fármacos eficaces, se necesitan modelos simples de la enfermedad. Mientras son diversos los organismos disponibles para modelizar los defectos mitocondriales de origen nuclear, son escasos los modelos para los defectos codificados por el mtDNA que, en general, no es susceptible de manipulaciones con las técnicas actuales. Para superar este obstáculo, la utilización de fibroblastos primarios derivados de los pacientes y híbridos transmitocondriales (obtenidos a partir de la fusión de citoplastos del paciente y la línea celular 143B206-Rho<sup>o</sup>) son herramientas útiles para hacer frente a los problemas fundamentales de la investigación de los trastornos mitocondriales debido a mutaciones en los genes del mtDNA [2,3]. Por su parte, la reciente tecnología de generación de iPSC a partir de células somáticas de donantes con enfermedades genéticas conocidas permite el modelado de éstas y estudiar su fisiopatología y comprender los mecanismos moleculares subyacentes [4]. De este modo, las iPSC ofrecen la oportunidad de establecer modelos *in vitro* de las enfermedades mitocondriales y teóricamente dirigir su diferenciación hacia los tipos celulares en particular que más se ven afectados por la enfermedad, como las neuronas. Sin embargo, este enfoque tiene varias desventajas ya que la técnica es compleja, costosa y lleva mucho tiempo. [5]. Por otra parte, algunos estudios muestran que la conversión de iPSCs puede rejuvenecer las mitocondrias y la capacidad energética de las células derivadas [6], una desventaja en el modelado de trastornos mitocondriales. Además, se sabe que hiPSCs son susceptibles de formar tumores después del trasplante [7].

Recientemente, la transdiferenciación de un tipo de célula a otra ha permitido convertir directamente los fibroblastos en células neuronales sin transitar por el estado pluripotente [10]. La primera conversión directa exitosa de fibroblastos murinos en neuronas inducidas (iN) se logró en 2010 cuando Wernig y sus colegas identificaron una combinación de tres factores proneurales (Ascl1, Brn2 y Myt11), que fueron capaces de convertir fibroblastos embrionarios y postnatales murinos en neuronas funcionales *in vitro* [11]. Alrededor de un año más tarde, este enfoque se tradujo en fibroblastos humanos, utilizando el factor adicional NeuroD1 para obtener iNs [12].

En los últimos años, se han encontrado nuevas herramientas y enfoques para mejorar la eficiencia de la conversión neuronal. Recientemente, se ha demostrado que las combinaciones de moléculas pequeñas y factores de crecimiento proneural, así como el silenciamiento de barreras de reprogramación como el complejo del factor de transcripción silenciador RE-1 (REST), pueden mejorar la eficiencia de conversión [8-10]. La reprogramación directa tiene varias ventajas en comparación con la generación de neuronas derivadas de iPSCs, como la relativa simplicidad y los requisitos de tiempo corto. Además, iNs, a diferencia de iPSCs, mantienen el envejecimiento [11] y las marcas epigenéticas del donante [12,13], lo que los convierte en excelentes candidatos para modelar la fisiopatología neuronal en los trastornos relacionados con la edad.

Además, se ha demostrado que las iN obtenidas mediante reprogramación *in vivo* no

causan procesos tumorígenos [14], lo que indica que en el futuro podrían ser una herramienta prometedora para la terapia celular. Por lo tanto, la generación de iN por reprogramación directa de fibroblastos derivados de pacientes que padecen enfermedades mitocondriales es una gran promesa para comprender la patogénesis de estos trastornos. Sin embargo, no se sabe si los fibroblastos derivados de los pacientes pueden ser directamente reprogramados en neuronas inducidas que reflejan el aspecto principal de las características patológicas de las enfermedades mitocondriales.

### **Tratamientos de las enfermedades mitocondriales**

Las terapias farmacológicas actuales de las enfermedades mitocondriales se basan fundamentalmente en: 1) Eliminar los metabolitos tóxicos; 2) Intentar circunvalar los bloqueos de la cadena respiratoria; 3) Administrar metabolitos y cofactores para mejorar la síntesis de ATP; 4) Prevenir el estrés oxidativo [15]. Estas estrategias incluyen el uso de agentes que mejoran la función de la cadena de transferencia de electrones (coenzima Q<sub>10</sub>, idebenona, riboflavina, dicloroacetato y tiamina), agentes que actúan como tampón energético (creatina), antioxidantes (vitamina C, vitamina E, ácido lipoico, donantes de cisteína y EPI-743), aminoácidos que restauran la producción de óxido nítrico (arginina y citrulina), protector de cardiolipina (elamipretida), agentes que potencian la biogénesis mitocondrial (bezafibrato, epicatequina, y RTA 408), y terapia con derivados de nucleótidos [16].

### **Nuevas aproximaciones terapéuticas**

**AMPK como diana terapéutica.** Ya que la autofagia/mitofagia podrían ser dianas terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades mitocondriales debido a su capacidad de suministrar nutrientes y eliminar las mitocondrias alteradas, una de las estrategias terapéuticas propuestas es la modulación de las proteínas responsables de la regulación de estos procesos. Entre ellas, la regulación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es potencialmente importante ya que tiene muchas funciones relacionadas con mantener la homeostasis mitocondrial y celular. La AMPK es una serina/treonina quinasa compuesta por una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$  [17]. La activación de AMPK se produce en respuesta a condiciones de estrés como los bajos niveles de glucosa, la hipoxia, la isquemia, el choque térmico y el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por *reactive oxygen species*) [18]. En estas situaciones, la relación intracelular AMP+ADP/ATP se incrementa y, a continuación la AMPK es activada por fosforilación. La AMPK también puede ser activada por fármacos como el análogo del AMP, 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -ribofuranósido (AICAR) o el anti-diabético metformina y varios productos naturales [19]. La AMPK estimula una cascada de señalización que promueve la glicólisis y oxidación de las grasas, aumenta las defensas antioxidantes y la autofagia, y disminuye la inflamación. La AMPK es una proteína clave en la regulación de la autofagia. En primer lugar, la AMPK activada promueve la autofagia mediante la inhibición de mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) [20]. Por otra parte, en condiciones de estrés o ayuno, la AMPK fosforila directamente a ULK-1 (Unc-51-Like Kinase 1), un inductor de la autofagia en mamíferos [21,22]. Aunque la autofagia es un proceso general en la célula, algunos autores sugieren que la activación de la autofagia es necesaria para la mitofagia [23]. Por lo tanto, la inducción de la autofagia por AMPK junto con el reclutamiento de Parkin a las mitocondrias defectuosas contribuye a la inducción de la mitofagia en las células de mamífero. En consecuencia, la activación de la AMPK podría mejorar los síntomas de las enfermedades mitocondriales que cursan con una autofagia/mitofagia alterada [24]. Del mismo modo, la AMPK tiene un papel importante en la regulación de la biogénesis mitocondrial que está estrechamente relacionada con la mitofagia. La regulación de la biogénesis mitocondrial depende de la activación de factores de transcripción que son

dianas de la AMPK. Uno de los factores reguladores más importante es PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma coactivator 1 alpha) [25]. PGC-1 $\alpha$  es directamente fosforilado y transactivado por AMPK [26]. Del mismo modo, PGC-1 $\alpha$  puede ser activado por desacetilación mediada por Sirt1 (Sirtuina-1) que también es inducida por la activación de AMPK [27]. PGC-1 $\alpha$  regula la expresión de muchas proteínas mitocondriales y aumenta la proliferación mitocondrial y la capacidad de la fosforilación oxidativa en modelos de ratón con miopatía mitocondrial [28]. Por tanto, la modulación de AMPK podría ser una posible estrategia terapéutica mediante la activación de PGC-1 $\alpha$  y el aumento de la biogénesis mitocondrial. Por último, pero no menos importante, la activación de AMPK podría proteger a las células con disfunción mitocondrial contra el estrés oxidativo, ya que AMPK promueve la expresión de enzimas antioxidantes como la MnSOD (Manganeso Superoxide Dismutase) y la catalasa [29]. Por todo ello, la AMPK tiene un papel esencial en la adaptación mitocondrial a diferentes alteraciones patológicas. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la biogénesis mitocondrial, el aumento de la respuesta antioxidante y la estimulación de la autofagia sirven como mecanismos compensatorios en respuesta a la degradación de las mitocondrias disfuncionales en las enfermedades mitocondriales [30]. De acuerdo con nuestros datos, (i) la activación inadecuada de la AMPK induce un fenotipo más grave en las mutaciones de los genes MTT, y (ii) la activación de la AMPK por AICAR o coenzima Q<sub>10</sub> restaura la mayoría de las alteraciones fisiopatológicas. Estos hallazgos sugieren que la AMPK tiene un papel central en la fisiopatología de las mutaciones de los genes MTT y podría convertirse en una diana terapéutica en las enfermedades mitocondriales. La activación defectuosa de la AMPK también se ha observado durante el envejecimiento [31] y en otras enfermedades asociadas con disfunción mitocondrial como la fibromialgia [32].

**mTOR como diana terapéutica.** La rapamicina ejerce sus efectos pro-autofágicos mediante la inhibición competitiva del complejo mTOR que es un regulador de diferentes vías intracelulares que controlan el crecimiento, la proliferación y la supervivencia. mTOR es un efector de la vía PI3K/AKT y lleva a cabo su acción mediante dos complejos diferentes, mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1 promueve el anabolismo, la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y la biogénesis de los lípidos. Al mismo tiempo, mTORC1 inhibe el catabolismo celular mediante el bloqueo de la autofagia. En su lugar, mTORC2 regula la supervivencia celular, la proliferación celular, el metabolismo y el citoesqueleto. Dada la importancia de la autofagia en las enfermedades mitocondriales es interesante estudiar el uso potencial de la rapamicina, en estos pacientes. Recientemente, se ha demostrado el efecto beneficioso del tratamiento con rapamicina en modelos celulares y animales de enfermedades mitocondriales y en otras patologías que presentan disfunciones mitocondriales [33].

**Mitofagia y biogénesis mitocondrial.** Las mutaciones en los genes del mtDNA manifiestan disfunción mitocondrial y activación de la mitofagia [34,35]. A este respecto, la mitofagia puede ser considerada como un mecanismo de protección para la eliminación de las mitocondrias disfuncionales que pueden provocar daños a la célula. La mitofagia debe ir acompañada a su vez de la activación de la biogénesis mitocondrial para compensar la pérdida de masa mitocondrial. Sin embargo, la mitofagia masiva y persistente puede comprometer a los mismos mecanismos compensatorios y afectar a la bioenergética celular, el flujo autofágico y finalmente causar la muerte celular. En el caso de las mutaciones heteroplásmicas del mtDNA, una alternativa terapéutica prometedora sería promover la eliminación selectiva del mtDNA mutante. Estudios realizados durante los últimos años han demostrado que el proceso de recambio mitocondrial no es aleatorio ya que las mitocondrias disfuncionales son preferentemente destinadas a su degradación por mitofagia [36,37]. De esta forma, la degradación de las mitocondrias disfuncionales (debido a los altos niveles de mutaciones deletéreas del mtDNA) promovería una

reducción progresiva de los niveles de la mutación patogénica.

**Dinámica mitocondrial.** La red mitocondrial en los mamíferos se mantiene en un equilibrio dinámico mediante el concurso de proteínas que promueven la fusión del orgánulo como la mitofusinas, Mfn1 y Mfn2, y la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) y las promotoras de la fisión como la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) y la proteína relacionada con dinamina-1 (Drp-1) [38,39]. Estos procesos opuestos de fusión/fisión determinan la organización y funcionamiento de la red mitocondrial de la célula [40]. Tanto la dinámica mitocondrial como la mitofagia desempeñan un papel esencial en la función mitocondrial y el recambio de las mitocondrias disfuncionales [41]. La manipulación de la dinámica mitocondrial es potencialmente un enfoque atractivo para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales, ya que el desplazamiento del equilibrio fusión/fisión puede permitir que las mitocondrias dañadas puedan ser rescatadas por fusión mitocondrial o bien tras fisionarse ser eliminadas por mitofagia [42]. Por todo ello, la modulación de la dinámica mitocondrial puede ser otra estrategia para modificar la heteroplasmia. Así, se ha demostrado que la fisión mitocondrial previene del aumento de la heteroplasmia en modelos celulares de las enfermedades mitocondriales. Por el contrario, el silenciamiento de Drp-1 produce un aumento del porcentaje de heteroplasmia [43]. Por tanto, el descubrimiento de nuevos inhibidores de la fusión y la fisión mitocondrial puede ser importante para el tratamiento de trastornos mitocondriales, tanto si están causadas por disfunciones de la dinámica mitocondrial o no.

**El inflammasoma como diana terapéutica en las enfermedades mitocondriales.** El inflammasoma es un complejo citosólico multiproteico que se ensambla como consecuencia de la infección, el estrés ambiental o el daño celular y que desempeña un papel esencial en la producción de interleucinas proinflamatorias (IL) tales como IL-1beta y IL-18 y la regulación de la respuesta inflamatoria [44,45]. Además de la producción de citocinas proinflamatorias, los complejos inflammasoma pueden modular diferentes vías de señalización que regulan diversas funciones fisiológicas, tales como la reparación de tejidos y la muerte celular por piroptosis [46]. Si bien todos los inflammasomas reconocen ciertos patógenos, es una característica distintiva del NLRP3 inflammasoma el ser activado por diferentes estímulos que lo convierten en el más flexible y adaptable, así como el inflammasoma clínicamente más relevante en la promoción de una respuesta inmune a las señales de estrés celular. Diversos autores han propuesto que las mitocondrias son las responsables principales de la activación del inflammasoma NLRP3 [47] y además, se ha demostrado que la autofagia está estrechamente relacionada con la inflamación [48]. Así, las proteínas autofágicas son capaces de activar o inhibir las respuestas inflamatorias, y las señales inflamatorias pueden inducir o inhibir la autofagia. En trabajos recientes hemos observado un aumento de la activación del inflammasoma NLRP3 en las células derivadas de pacientes con enfermedades mitocondriales como MELAS, MERRF, LHON (*Leber's Hereditary Optic Neuropathy*) y fibromialgia [49].

## **Hipótesis**

Nuestra hipótesis propone que el tratamiento personalizado *in vitro* de los fibroblastos y células neuronales derivados de los pacientes mitocondriales 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 mitocondriales.**
- 2) Cribado de fármacos en los fibroblastos derivados de los pacientes mitocondriales. 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 mitocondriales.**
- 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 mitocondriales.** La selección de las alteraciones que permitan la evaluación de la efectividad de los tratamientos en el cribado farmacológico. En el laboratorio disponemos en la actualidad de 10 líneas de fibroblastos derivados de pacientes mitocondriales con mutaciones en el mtDNA (MT-TL1, MT-TK, MT-RNR1) y nDNA (NDUFS1, GFM1, COX15, OPA1, LIPT 01 y POLG; mutaciones en el gen KAT6A que afecta secundariamente a la función mitocondrial también se incluyen en el estudio). Los fibroblastos fueron obtenidos en el trascurso de proyectos anteriores (FIS 2010/00543, FIS 2013/00129 y SAS 2010/0289, FIS, PI16/00786) y de acuerdo con las declaraciones de Helsinki de 1964, revisada en 2001. Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo al diagnóstico molecular y a la clínica compatible con enfermedad mitocondrial. Los controles sanos fueron reclutados en los Hospitales Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla.
- 2) **Tarea 1.1.** Selección de las alteraciones fisiopatológicas apropiadas para la evaluación de la efectividad de los tratamientos en el cribado farmacológico

Niveles de expresión de las proteínas mutadas

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>

- 3) **Cribado de fármacos en los fibroblastos derivados de los pacientes mitocondriales. 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 control y mutantes serán sembrados en placas de 24 pocillos. La distribución de reactivos de ensayo y medios de cultivo será realizada por la una estación automática de manejo de líquidos ((Biomek FX, Block). Posteriormente, ensayaremos una librería farmacología utilizados 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 mitocondriales.

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, glutation, 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 Inflamasoma: 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) 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 el control y los fibroblastos mutantes. Así, tras el tratamiento con los compuestos favorables seleccionados estudiaremos en profundidad la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la mitofagia y la biogénesis mitocondrial, así como las tasas de apoptosis espontánea e inducida.

#### **4) 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 [8,50-52] Utilizaremos vectores lentivirales que contienen factores de transcripción específicos del linaje neural. Brevemente, colocaremos fibroblastos derivados de pacientes 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 *Acs11* y *Brn2*. Tres días después de la transducción viral, el medio de fibroblastos será reemplazado por un medio de diferenciación neuronal complementado con factores de crecimiento neuronal. 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 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. (40). 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). Compararemos los resultados obtenidos con los tratamientos a las distintas concentraciones y los obtenidos con un control sin tratar.

**PRESUPUESTO (duración: 3 años)**

CONCEPTOS	AÑOS		
	1 <sup>er</sup> AÑO	2 <sup>do</sup> AÑO	3 <sup>er</sup> AÑO
<b>Bienes y Servicios:</b>			
Cultivos, Anticuerpos & Western blotting	<b>7.000</b>	<b>7.000</b>	<b>7.000</b>
PCR quantitative	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>
Reactivos Biología Molecular	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>
Servicios de microscopía y citometría	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>
Ensayos bioquímicos	<b>2.000</b>	<b>2.000</b>	<b>2.000</b>
Síntesis de proteínas mitocondriales	<b>2.000</b>	<b>2.000</b>	<b>2.000</b>
Cribado	<b>2.000</b>	<b>2.000</b>	<b>2.000</b>
Entrega de muestras	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>
Reprogramación a neuronas	<b>5.000</b>	<b>5.000</b>	<b>5.000</b>
<b>Total:</b>	<b>21.000</b>	<b>21.000</b>	<b>21.000</b>
<b>Personal:</b>			
Becario	<b>18.000</b>	<b>18.000</b>	<b>18.000</b>
<b>TOTAL ANNUAL</b>	<b>39.000 EUR</b>	<b>39.000 EUR</b>	<b>39.000 EUR</b>
<b>TOTAL PROYECTO:</b>	<b>117.000 EUR</b>		

PLAN DE TRABAJO		1 <sup>er</sup> año	2 <sup>do</sup> año	3 <sup>er</sup> año	Participantes
<b>Objetivo 1</b>	Fisiopatología para la detección de los compuestos	X			MAC JMSR, CS
<b>Objetivo 2</b>	<b>tarea 2.1</b> Cribado	X	X		IVG,MAC, CS
	<b>tarea 2.2</b> Confirmación de compuestos positivos		X		IVG, JMSR, CS
<b>Objetivo 3</b>	Generación de neuronas inducidas	X	X		MVP, SPC, CS
<b>Objetivo 4</b>	Evaluación de los compuestos positivos en las células neuronales			X	MVP, SPC, CS

**Equipo de investigación:**

El equipo de trabajo está formado por 5 estudiantes de doctorado: Marina Villanueva Paz (**MVP**), Licenciada en Biotecnología; Suleva Povea Cabello (**SPC**), Graduada en Nutrición; Mónica Álvarez Córdoba (**MAC**), Licenciada en Biología; Juan Miguel Suarez Rivero (**JMSR**), Graduado en Biología; Irene Villalón García (**IVG**), Graduada en Nutrición. Contratado solicitado (**CS**), Graduado en Biotecnología, Bioquímica, Biología o afines.

**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 fisiopatología de las enfermedades mitocondriales (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sanchez+alcazar>; [https://www.researchgate.net/profile/Jose\\_Sanchez-Alcazar](https://www.researchgate.net/profile/Jose_Sanchez-Alcazar)).

Estos estudios han llevado a la identificación del papel fundamental de la mitofagia en la fisiopatología de estas enfermedades. Por otra parte, sus estudios han demostrado el efecto beneficioso de la coenzima Q<sub>10</sub> y riboflavina en modelos celulares de las enfermedades mitocondriales.

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.

## Referencias

1. Zeviani M, Carelli V (2007) Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 20 (5):564-571
2. Khan SM, Smigrodzki RM, Swerdlow RH (2007) Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects. *American journal of physiology Cell physiology* 292 (2):C658-669
3. King MP, Attardi G (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246 (4929):500-503
4. Colman A, Dreesen O (2009) Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell stem cell* 5 (3):244-247
5. Dolmetsch R, Geschwind DH (2011) The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell* 145 (6):831-834. doi:10.1016/j.cell.2011.05.034
6. Suhr ST, Chang EA, Tjong J, Alcasid N, Perkins GA, Goissis MD, Ellisman MH, Perez GI, Cibelli JB (2010) Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PloS one* 5 (11):e14095. doi:10.1371/journal.pone.0014095
7. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature biotechnology* 27 (8):743-745. doi:10.1038/nbt.1554
8. Drouin-Ouellet J, Lau S, Brattas PL, Rylander Ottosson D, Pircs K, Grassi DA, Collins LM, Vuono R, Andersson Sjolund A, Westergren-Thorsson G, Graff C, Minthon L, Toresson H, Barker RA, Jakobsson J, Parmar M (2017) REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO molecular medicine* 9 (8):1117-1131. doi:10.15252/emmm.201607471
9. Pfisterer U, Ek F, Lang S, Soneji S, Olsson R, Parmar M (2016) Small molecules increase direct neural conversion of human fibroblasts. *Scientific reports* 6:38290. doi:10.1038/srep38290
10. Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, Herms S, Wernet P, Kogler G, Muller FJ, Koch P, Brustle O (2012) Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nature methods* 9 (6):575-578. doi:10.1038/nmeth.1972
11. Mertens J, Paquola ACM, Ku M, Hatch E, Bohnke L, Ladjevardi S, McGrath S, Campbell B, Lee H, Herdy JR, Goncalves JT, Toda T, Kim Y, Winkler J, Yao J, Hetzer MW, Gage FH (2015) Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell* 17 (6):705-718. doi:10.1016/j.stem.2015.09.001
12. Huh CJ, Zhang B, Victor MB, Dahiya S, Batista LF, Horvath S, Yoo AS (2016) Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.18648
13. Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14 (10):R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115
14. Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, Björklund A, Grealish S, Parmar M (2013) Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (17):7038-7043
15. Parikh S, Saneto R, Falk MJ, Anselm I, Cohen BH, Haas R, Medicine Society TM (2009) A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Current treatment options in neurology* 11 (6):414-430
16. El-Hattab AW, Zarante AM, Almannai M, Scaglia F (2017) Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Molecular genetics and metabolism* 122 (3):1-9. doi:10.1016/j.ymgme.2017.09.009
17. Hardie DG (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144 (12):5179-5183. doi:10.1210/en.2003-

0982

18. Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB (2005) AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 26 (2):69-76
19. Hardie DG (2013) AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes* 62 (7):2164-2172. doi:10.2337/db13-0368
20. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30 (2):214-226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003
21. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331 (6016):456-461. doi:10.1126/science.1196371
22. Roach PJ (2011) AMPK -> ULK1 -> autophagy. *Mol Cell Biol* 31 (15):3082-3084. doi:10.1128/mcb.05565-11
23. Gilkerson RW, De Vries RLA, Lebot P, Wikstrom JD, Torgyeke E, Shirihai OS, Przedborski S, Schon EA (2012) Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition. *Hum Mol Genet* 21 (5):978-990. doi:10.1093/hmg/ddr529
24. Viscomi C, Bottani E, Civiletto G, Cerutti R, Moggio M, Fagiolari G, Schon EA, Lamperti C, Zeviani M (2011) In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$  axis. *Cell Metab* 14 (1):80-90. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.011
25. Hawley DGH, Fiona AR, Simon A (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13:251-262. doi:doi:10.1038/nrm3311
26. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (29):12017-12022. doi:10.1073/pnas.0705070104
27. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458:1056-1060. doi:10.1038/nature07813  
10.1038/nature07813.
28. Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, Moraes CT (2008) Activation of the PPAR/PGC-1 $\alpha$  pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab* 8 (3):249-256. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.006
29. Li X-N, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, Coselli JS, Chen L, Wang XL, Zhang Y, Shen YH (2009) Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes* 58 (10):2246-2257. doi:10.2337/db08-1512
30. Garrido-Maraver J, Paz MV, Cordero MD, Bautista-Lorite J, Oropesa-Avila M, de la Mata M, Pavon AD, de Lavera I, Alcocer-Gomez E, Galan F, Ybot Gonzalez P, Cotan D, Jackson S, Sanchez-Alcazar JA (2015) Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. *Biochimica et biophysica acta* 1852 (11):2535-2553. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.027
31. Salminen A, Kaarniranta K (2012) AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing research reviews* 11 (2):230-241
32. Alcocer-Gomez E, Garrido-Maraver J, Bullon P, Marin-Aguilar F, Cotan D, Carrion AM, Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Sanchez-Alcazar JA, Battino M, Cordero MD (2015) Metformin and caloric restriction induce an AMPK-dependent restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia patients. *Biochimica et biophysica acta* 1852 (7):1257-1267. doi:10.1016/j.bbadis.2015.03.005

33. Johnson SC, Yanos ME, Kayser E-B, Quintana A, Sangesland M, Castanza A, Uhde L, Hui J, Wall VZ, Gagnidze A, Oh K, Wasko BM, Ramos FJ, Palmiter RD, Rabinovitch PS, Morgan PG, Sedensky MM, Kaeberlein M (2013) mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* 342 (6165):1524-1528. doi:10.1126/science.1244360
34. Cotan D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, Rodriguez-Hernandez A, Gomez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Jackson S, Navas P, Sanchez-Alcazar JA (2011) Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J* 25 (8):2669-2687. doi:10.1096/fj.10-165340
35. de la Mata M, Garrido-Maraver J, Cotán D, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, Izquierdo LG, de Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Ybot P, Jackson S, Sánchez-Alcázar JA (2012) Recovery of MERRF Fibroblasts and Cybrids Pathophysiology by Coenzyme Q10. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9 (2):446-463
36. Goldman SJ, Taylor R, Zhang Y, Jin S (2010) Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion* 10 (4):309-315
37. Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* 8 (1):3-5. doi:10.1089/rej.2005.8.3
38. Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125 (7):1241-1252. doi:10.1016/j.cell.2006.06.010
39. Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18 (R2):R169-176. doi:10.1093/hmg/ddp326
40. Twig G, Shirihai OS (2011) The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14 (10):1939-1951. doi:10.1089/ars.2010.3779
41. Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology* 11 (12):872-884. doi:10.1038/nrm3013
42. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27 (2):433-446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963
43. Malena A, Loro E, Di Re M, Holt IJ, Vergani L (2009) Inhibition of mitochondrial fission favours mutant over wild-type mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 18 (18):3407-3416. doi:10.1093/hmg/ddp281
44. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, Roberts TL, Schroder K, Vince JE, Hill JM, Silke J, Stacey KJ (2013) AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell death and differentiation* 20 (9):1149-1160. doi:10.1038/cdd.2013.37
45. Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA (2015) Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology* 25 (5):308-315. doi:10.1016/j.tcb.2014.12.009
46. Miao EA, Rajan JV, Aderem A (2011) Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews* 243 (1):206-214. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x
47. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469 (7329):221-225. doi:10.1038/nature09663
48. Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews* 13 (10):722-737. doi:10.1038/nri3532
49. Cordero MD, Alcocer-Gomez E, Marin-Aguilar F, Rybkina T, Cotan D, Perez-Pulido A, Alvarez-Suarez JM, Battino M, Sanchez-Alcazar JA, Carrion AM, Culic O, Navarro-Pando JM, Bullon P (2015) Mutation in cytochrome b gene of mitochondrial DNA in a

family with fibromyalgia is associated with NLRP3-inflammasome activation. *Journal of medical genetics*. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103392

50. Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, Bjorklund A, Lindvall O, Jakobsson J, 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 (25):10343-10348. doi:10.1073/pnas.1105135108

51. Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, Bjorklund A, Grealish S, 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 (17):7038-7043. doi:10.1073/pnas.1303829110

52. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 (7284):1035-1041. doi:10.1038/nature08797