



Fundació

La Marató de TV3

20^e SIMPOSIUM

Enfermedades neurodegenerativas



BIOMEDICINA DE SISTEMAS PARA DESCIFRAR LAS BASES MOLECULARES Y EL MODELO DE LA ENFERMEDAD DE MOTONEURONA CORTICOESPINAL

Carlos Casasnovas Pons

IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

M. Jesús Sobrido Gómez

Fundación Ramon Dominguez

Cristina Pujades Corbi

Parc de Recerca Biomèdica de BCN / Universitat Pompeu Fabra

Mariona Juvé Font

IRBLL Institut Recerca Biomèdica de Lleida

1. Resumen

El conocimiento actual sobre la paraplejía espástica hereditaria (HSP) y otras enfermedades que afectan a las motoneuronas, sugiere que la degeneración axonal que comparten es una consecuencia final de la alteración de procesos tales como composición de la mielina, crecimiento de neuronas, adhesión y señalización celular, producción energética de la mitocondria, metabolismo de nucleótidos, acoplamiento y transporte de microtúbulos, biogénesis del retículo endoplásmico o metabolismo de los lípidos.

Los objetivos de este proyecto han sido: 1) construcción de una base de datos de familias españolas con enfermedades de motoneurona bien caracterizadas clínica y genéticamente, sugiriendo alteración de mielina y/o genes implicados en enfermedades de motoneurona; 2) identificación y caracterización metabólica y funcional de nuevas variantes y/o genes implicados en enfermedades de motoneurona, y 3) desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* de degeneración de motoneurona.

Para alcanzar estos objetivos, hemos realizado estudios de secuenciación de última generación (NGS) en 88 familias con enfermedad de motoneurona sin diagnóstico, llegando a un diagnóstico en 46, descubriendo 7 nuevos genes candidatos y no hallando en 35 familias ningún gen candidato. El rendimiento del diagnóstico molecular ha sido del 60%. Para encontrar nuevos metabolitos y vías metabólicas involucradas en las enfermedades de motoneurona, hemos realizado estudios de integración de metabolómica y lipidómica y hemos identificado, en pacientes con adrenomieloneuropatía, una firma lipidómica que se define por niveles altos de fosfolípidos, glicerolípidos, esfingolípidos o esteroides. Además, hemos generado dos modelos de degeneración de motoneurona *in vivo* (pez cebra), *knock-out* de *plp1* i de *degs1*, que nos ayudarán a una mejor comprensión de la fisiopatología de estas enfermedades en humanos. Los primeros pacientes de una de ellas, el déficit de *DGS1*, han sido diagnosticados y publicados por nuestro grupo gracias a este proyecto.

2. Resultados obtenidos

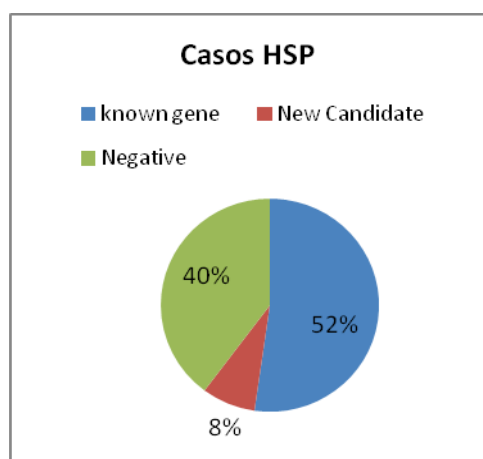
1. Secuenciación de última generación (NGS) y análisis bioinformático

Hemos **secuenciado el exoma completo** de 88 familias con enfermedad de motoneurona sin diagnóstico, habiendo llegado a un diagnóstico en 46, hemos encontrado 7 nuevos genes candidatos y en 35 familias no hemos hallado ningún gen candidato. El rendimiento diagnóstico molecular ha sido del 60%.

De los casos diagnosticados, hemos encontrado 6 variantes de cambio de marco de lectura (*frameshift*), 27 no sinónimas (*missense*), 3 deleciones sin cambio de marco de lectura (*nonframeshift deletion*), 6 de empalme (*splicing*) y 4 de terminación prematura de la proteína (*stop-gain*). De estas variantes, 25 no habían sido descritas previamente.

Hemos realizado **estudios de segregación** en todas las familias en las que hemos encontrado genes candidatos en el análisis del exoma. En total hemos realizado la validación por Sanger de 228 variantes, que se corresponden a 128 genes diferentes, en todos los miembros de la familia de los que disponíamos de DNA. Para la evaluación y clasificación de las variantes hemos seguido las directrices del American College of Medical Genetics (ACMG) y la Association for Molecular Pathology (AMP) (Richards S *et al.*, Genet Med., 2015, 17:405-24; Amendola LM *et al.*, Am J Hum Genet., 2016, 98:1067-76). Según estas directrices, hemos identificado 24 variantes patogénicas, 16 variantes probablemente patogénicas y 6 variantes de significación desconocida (VUS).

Hemos realizado **estudios de validación *in vitro*** en 8 genes:



CAPN1: *Western blot* y otras pruebas funcionales han confirmado este gen como causante de la enfermedad en el paciente en estudio.

GFAP: estudios de transfección y microscopía han confirmado este gen como causante de la enfermedad en el paciente en estudio.

SCN4A: ensayos de transfección de minigenes para evaluar la existencia de anomalías de empalme (Fichou Y *et al.*, Transfusion, 2015, 55:1432-43) han

descartado este gen como causante de la enfermedad en el paciente en estudio.

SPG11: estudios de cDNA al tratarse de una mutación de empalme para confirmar si las mutaciones están en heterocigosis compuesta, al no disponer de ADN de los padres. Los estudios han confirmado este gen como causante de la enfermedad en el paciente en estudio.

ERBB4: ensayos de transfección de minigenes para evaluar la existencia de anomalías de empalme, ya que este gen no se expresa en sangre ni fibroblastos. Los análisis han descartado este gen como causante de la enfermedad en el paciente en estudio.

PNKP: estudios de cDNA y ensayos de transfección de minigenes para evaluar la existencia de anomalías de empalme. Los análisis han descartado este gen como causante de la enfermedad en el paciente en estudio.

Además, estamos realizando estudios de validación en 2 casos de variantes en genes no asociados a enfermedad hasta ahora. En uno de los casos hemos realizado estudios de cDNA y, en colaboración con un grupo de Estrasburgo, estamos realizando estudios de complementación en levadura. En el otro caso estamos realizando estudios de clonación y transfección, así como otros estudios de expresión de proteína y efecto en el transporte celular en fibroblastos.

En 29 casos en los que no hemos llegado a ningún diagnóstico con la secuenciación del exoma completo, hemos procedido a la secuenciación del genoma completo. En la actualidad estamos realizando el estudio bioinformático de estos casos, que presenta una gran complejidad debido a la ingente cantidad de datos que generan estos estudios. Como en el caso del estudio del exoma, los genes candidatos serán validados por Sanger aunque haya finalizado el proyecto.

2. Caracterización metabólica de genes implicados en enfermedades de motoneurona

Con el fin de buscar huellas metabólicas indicativas de enfermedad degenerativa de motoneurona, nos hemos centrado en pacientes de una de las enfermedades más representativas de las que cursan con degeneración de motoneurona, la adrenoleucodistrofia ligada a X (X-ALD). La X-ALD es un trastorno neurometabólico hereditario causado por mutaciones en el gen *ABCD1* y caracterizado por una progresiva paraplejía espástica que afecta a los tractos corticoespinales y cursa con

insuficiencia adrenal. Se han descrito diferentes fenotipos de X-ALD: a) adrenomieloneuropatía (AMN), que se inicia en edad adulta, afecta principalmente a la médula espinal en forma de paraparesia espástica y no tiene carácter inflamatorio importante; b) AMN cerebral (AMNc), pacientes AMN que desarrollan demencia, desórdenes del comportamiento y presencia de respuesta inflamatoria en sustancia blanca; c) adrenoleucodistrofia cerebral infantil (ALDc), con inicio entre los 3 y los 10 años de edad y que se caracteriza por una respuesta inflamatoria que causa desmielinización.

En esta parte del estudio nos hemos basado en los fenotipos clínicos que cursan con paraparesia espástica, es decir, AMN y AMNc. Hemos utilizado muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y hemos aplicado métodos de metabolómica y lipidómica basados en espectrometría de masas.

Para analizar el perfil metabólico característico de cada uno de los fenotipos estudiados hemos realizado un análisis multivariante en el que se estudia la composición de metabolitos y, de forma específica, de especies lipídicas presentes en estas muestras. Inicialmente hemos aplicado un análisis de componentes principales, seguido de un análisis de agrupamiento jerárquico. Tales pruebas han indicado que existe una firma lipidómica común en pacientes AMN y AMNc, que parece definirse por niveles más altos de fosfolípidos, glicerolípidos, esfingolípidos o esteroides. Con el test de ANOVA hemos identificado 108 moléculas diferencialmente expresadas entre los grupos.

Posteriormente hemos integrado los resultados obtenidos en los estudios de metabolómica y lipidómica, para realizar un análisis de enriquecimiento con el fin de hallar nuevas vías metabólicas afectadas. Hemos identificado 5 ceramidas aumentadas en X-ALD. Las ceramidas pertenecen a la familia de los esfingolípidos y son potentes moléculas de señalización que intervienen en procesos celulares tanto fisiológicos como fisiopatológicos. Hay evidencias de que la acumulación aberrante de ceramidas es neurotóxica e interviene en la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. Además, todos los glicerolípidos identificados en este estudio están aumentados en X-ALD. Estos resultados refuerzan la idea de que el metabolismo lipídico desempeña un papel crucial en la neurodegeneración motora y ofrece buenos candidatos para futuras investigaciones de otras enfermedades de motoneurona.

3. Desarrollo de modelos *in vivo* de degeneración de motoneurona

Para validar la patogenicidad de los genes candidatos hemos utilizado como modelo el pez cebra, debido a las ventajas que presenta para el análisis funcional. En primer lugar, hemos identificado genes candidatos y hemos realizado estudios filogenéticos para conocer el número de genes ortólogos en el pez. Una vez identificados los mejores ortólogos con estudios de subfuncionalidad, hemos analizado los perfiles de expresión de los genes. En segundo lugar, hemos llevado a cabo tres aproximaciones funcionales consecutivas según los requerimientos del gen candidato:

a) Generación de peces con pérdida transitoria de función del gen por inyección de Morpholino con defecto del empalme.

b) Generación de líneas de pez cebra *knock-out* estables utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/CAS9. Aunque esta técnica es muy interesante, varios informes han demostrado que se producen compensaciones génicas en el caso de genes cruciales para el organismo.

c) En los casos en que la mutación del paciente da lugar a una ganancia de función del gen (GOF), hemos inyectado los embriones mRNA del gen en estudio.

Tras el análisis de las mutaciones encontradas en los pacientes, hemos escogido los siguientes genes: *plp1b*, *pgm2*, *dync1*, *degs1* y *fus*. Después de análisis preliminares de la estructura gen/proteína hemos observado que algunas mutaciones no causan fenotipo, por lo que hemos centrado nuestros estudios en los genes *plp1b* y *degs1*. Conforme a los objetivos del estudio, una vez identificados los genes mutados en los pacientes, hemos seguido la siguiente estrategia:

CLONACIÓN GÉNICA

- Genes de pez cebra para el perfil de expresión (ISH)
- Genes humanos para estudios de GOF

EXPERIMENTOS FUNCIONALES

- LOF: CRISPR-Cas9/ Morpholinos
- Estudios de rescate/ no rescate
- Estudios de GOF: inyección de mRNA

ANÁLISIS FENOTÍPICO

- Células de Mauthner: 3A10
- Organización de las motoneuronas: α -Isl1
- Ramificación axonal: α -znp
- Comportamiento

3.1. Estudios filogenéticos

Uno de los pacientes presentaba una mutación en el gen *PLP1*. Aunque mutaciones en *PLP1* pueden producir tanto HSP como esclerosis lateral amiotrófica (según la localización de la mutación en el gen) y es un gen bien estudiado, se sabe poco acerca de su participación en la actividad mitocondrial y de su efecto sobre el comportamiento locomotor asociado a las diferentes mutaciones que provocan HSP. Mediante los estudios filogenéticos hemos hallado dos genes ortólogos en el pez cebra, *zplp1a* y *zplp1b*. Con los estudios de expresión espacio-temporal del gen por RT-PCR e hibridación *in situ* hemos observado que *zplp1a* y *zplp1b* se expresan durante la embriogénesis y que *plp1b* es el único que se expresa en el territorio de interés (oligodendrocitos). Estos resultados serán publicados el presente año (Joya *et al.*, 2019, en preparación).

El otro gen mutado en el que nos hemos concentrado es *DEGS1*. La proteína DEGS1 es una desaturasa que cataliza la conversión de dihidroceramida (DhCer) a ceramida (Cer) en la vía de síntesis *de novo*. Los estudios filogenéticos han demostrado un alto grado de identidad entre el gen humano y el del pez cebra. En este caso, la expresión del gen está enriquecida en la etapa de larva en cerebro y médula espinal, en especial en oligodendrocitos.

3.2. Diseño de la estrategia funcional, generación y caracterización de los peces mutantes

En el caso del gen *PLP1*, hemos diseñado una estrategia CRISPR-CAS9 con el fin de desactivar las diferentes variantes de *plp1b* presentes en el pez cebra.

En el caso del gen *DEGS1*, debido a la complejidad de la proteína, hemos decidido desactivar el gen con el uso del Morpholino bloqueador del empalme (MO-DEGS1 e2i2).

3.3. Cribado fenotípico

Hemos dividido los análisis fenotípicos en las siguientes etapas:

- Efectos en las células: células de Mauthner (tinción 3A10), motoneuronas (anti-Isl1), desarrollo y conexión de las motoneuronas axonales (anti-znp).
- Análisis del comportamiento locomotor espontáneo.
- Actividad mitocondrial basada en el uso de Tg [UAS: mitoDsRed].

Nuestros estudios han demostrado que el modelo de pez cebra MO-DEGS1 presenta un aumento de 10 veces del cociente DhCer/Cer, un número reducido de oligodendrocitos (alteración de la mielinización) y discapacidad locomotora, consistente con el fenotipo de los pacientes. Además, hemos demostrado también que el fármaco FTY720 mejora el fenotipo del pez. En colaboración con grupos internacionales, hemos reunido 19 pacientes con mutaciones en *DEGS1*, que presentan un fenotipo compatible con los casos españoles. La descripción de los pacientes y los resultados obtenidos en el pez han sido publicados recientemente (Pant *et al.*, 2019, J Clin Invest). En estos momentos hemos empezado un tratamiento de uso compasivo con FTY720 en algunos de los pacientes diagnosticados.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

A pesar de algunos ejemplos alentadores, un diagnóstico no siempre conlleva un tratamiento. La realidad es que la mayoría de las enfermedades mendelianas conocidas no pueden ser tratadas con éxito, al menos en la actualidad. Sin embargo, para las familias afectadas, no puede infravalorarse la importancia de recibir un diagnóstico específico y correcto. Los pacientes con paraparesia espástica requieren a menudo atención a tiempo completo desde muy jóvenes, situación que supone una carga muy pesada para su familia. Resulta fascinante comprobar la dedicación y amor que muestran las familias en el cuidado de personas con déficits neurológicos complejos a lo largo de muchos años. Para ellos, el simple conocimiento de la explicación real de la enfermedad puede proporcionar confort. El diagnóstico correcto también puede facilitar la prestación de servicios sanitarios y sociales, así como un consejo genético adecuados. Por supuesto, la esperanza es que conocer el diagnóstico correcto también permitirá un enfoque más específico en futuras terapias a medida que se vayan descubriendo. La aplicación precoz de la secuenciación de última generación (NGS) puede acabar con la “odisea diagnóstica” que a menudo es tediosa, costosa y emocionalmente espeluznante; por todos los motivos mencionados anteriormente, el uso de NGS es simplemente una buena práctica médica. Hay pocas áreas terapéuticas que puedan beneficiarse más de este nuevo paradigma en la genética clínica que los trastornos neurológicos, en especial los que afectan a niños. Existen varias razones interconectadas para ello: ya se ha demostrado que muchas de las enfermedades neurológicas tienen una base genética; es difícil a menudo prever el defecto genético

según la clínica del paciente; se están describiendo nuevas variantes causantes semanalmente, y resulta costoso y pesado realizar estudios gen por gen. Además, el coste global de los trastornos neurológicos inexplicables es inmenso. La NGS puede facilitar el diagnóstico molecular individualizado en pacientes y familias con enfermedades no diagnosticadas hasta ahora y sin explicación.

El modelo diagnóstico tradicional para la evaluación de un individuo con un trastorno genético putativo incluye la formulación de una hipótesis diagnóstica que puede incluir un abanico de posibilidades. Estos posibles diagnósticos se testan a través de una variedad de análisis: bioquímicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo), estructurales (RMN), funcionales (EEG) y de genes específicos. Un estudio reciente examinó las implicaciones económicas del diagnóstico basado en el estudio de secuencias completas del exoma (WES) en el contexto de 500 pacientes evaluados mediante pruebas genéticas tradicionales (Shashi V *et al.*, Genet Med. 2014 Feb; 16: 176-82). Este trabajo demostró que si el diagnóstico no es clínicamente evidente en la primera visita, el coste medio por diagnóstico genético realizado con pruebas tradicionales es aproximadamente de 25.000 dólares. El coste del WES, por su parte, actualmente es inferior a los 500 euros por muestra. Por lo tanto, cuando se utiliza en un entorno adecuado, el WES posee el potencial de proporcionar un beneficio de coste significativo para el presupuesto sanitario y para la sociedad. Este proyecto ha permitido el diagnóstico de 46 familias que, con los métodos tradicionales, habían quedado sin diagnosticar. La implementación de esta metodología en las primeras etapas del diagnóstico habría ahorrado, a la sanidad pública, costes muy elevados. Con este fin se está realizando un estudio colaborativo en el que participan los principales hospitales de Cataluña y del que nuestro grupo forma parte, financiado por la Generalitat, que finalizará a finales del 2019 (Implementación de la medicina personalizada basada en la genómica en enfermedades raras neurológicas no diagnosticadas; SLT002 / 16/00174-PERIS).

4. Bibliografía científica generada

La Marató de TV3 figura en los agradecimientos

Schlüter A, Vélez-Santamaría PV, Verdura E, Ruiz M, Fourcade S, Rodríguez-Palmero A, González-Gutiérrez-Solana L, López de Munain A, Macaya A, Casasnovas C, Pujol A.

Molecular diagnosis of spastic paraparesia and cerebellar ataxias as a continuous spectrum, using a novel network based computational approach.

2019. En preparación.

Schlüter A, Rodriguez-Palmero A, Verdura E, Ruiz M, Fourcade S, Vélez-Santamaría PV, Beltran S, Redin C, Mandel JL, Artuch R, Aguilera S, Yoldi ME, O'Callaghan MDM, Armstrong J, Vázquez E, González-Gutiérrez-Solana L, López de Munain A, Macaya A, Casasnovas C, Pujol A.

Diagnosis of inherited white matter diseases by whole-exome sequencing and clinically-driven disease gene prioritization.

En preparación.

Rodriguez-Palmero A, Schlüter A, Verdura E, Ruiz M, Le Gac G, Gourlaouen I, Ka C, Lobato R, Casasnovas C, Fourcade S, Pujol A.

A novel intronic splicing mutation in EIF2B5 gene is associated with ovarioleukodystrophy.

2019. En preparación.

Joya X, Voltes A, Pant D, Terriente J, Fdez-Hevia C, Pujol A, Pujades C.

An alternative in vivo model for studying PLP1b disrupted spastic paraplegias.

2019. En preparación.

Rattay T,...., Pujol A, Bassi M, D'Angelo MG, De Jonghe P, Zuchner S, Schoels L, Schüle R.

FAHN/SPG35: a narrow phenotypic spectrum across disease classifications.

Brain 2019 (BRAIN-2018-01784), en prensa. IF: 10.840.

Casasnovas C, Verdura E, Vélez-Santamaria V, Schlüter A, Pons-Escoda A, Homedes C, Ruiz M, Fourcade S, Launay N, Pujol A.

A novel mutation in the GFAP gene expands the phenotype of Alexander Disease.

J Med Genet, 2019, (jmedgenet-2018-105959), en prensa. IF: 5.751.

Pant D, Dorboz I, Schluter A, Fourcade S, Launay N,(35 coauthors). Gleeson JG, Pujades C, Fatemi A, Boespflug-Tanguy-O, Pujol A.

Loss of the sphingolipid desaturase DEGS1 causes an hypomyelinating leukodystrophy with fingolimod as potential therapy.

J Clin Invest 2019 Jan 8. pii: 123959. IF: 13.25.

Falkenberg KD, Braverman NE, Moser AB, Steinberg SJ, Klouwer FC, Schlüter A, Ruiz M, Pujol A, Engvall M, Naess K, van Spronsen FJ, Körver-Keularts I, Rubio-Gozalbo ME, Ferdinandusse S, Wanders RJA, Waterham HR.

Allelic Expression Imbalance Promoting a Mutant PEX6 Allele Causes Zellweger Spectrum Disorder.

Am J of Hum Genet, 2017 Dec 7;101(6):965-976. IF: 9.03.