



**Fundació**  
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM  
Malalties neurodegeneratives



## **BIOMEDICINA DE SISTEMES PER DESENTRELLAR LES BASES MOLECULARS I EL MODEL DE LA MALALTIA DE LA MOTONEURONA CORTICOESPINAL**

### **Carlos Casanovas 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. Resum

El coneixement actual sobre la paraplegia espàstica hereditària (HSP) i d'altres trastorns que afecten les motoneurons suggereix que la degeneració axonal que comparteixen és una conseqüència final de l'alteració de processos com la composició de la mielina, el creixement de neurones, l'adhesió i senyalització cel·lular, la producció energètica de la mitocondria, el metabolisme de nucleòtids, l'acoblament i transport dels microtúbuls, la biogènesi del reticle endoplasmàtic o el metabolisme dels lípids. Els objectius d'aquest projecte han estat: 1) construcció d'una base de dades de famílies espanyoles amb malalties de motoneurona ben caracteritzades clínicament i genèticament, tot suggerint alteració de mielina i/o metabolisme lipídic; 2) identificació i caracterització metabòlica i funcional de noves variants i/o gens implicats en malalties de motoneurona, i 3) desenvolupament de models *in vitro* i *in vivo* de degeneració de motoneurona.

Per aconseguir aquests objectius hem realitzat estudis de seqüenciació d'última generació (NGS) en 88 famílies amb malaltia de motoneurona sense diagnòstic i hem arribat a un diagnòstic en 46 famílies, hem trobat 7 gens candidats nous i en 35 famílies no hem trobat cap gen candidat. El rendiment diagnòstic molecular ha estat del 60%. Per tal de trobar nous metabòlits i vies metabòliques implicades a les malalties de motoneurona, hem realitzat estudis d'integració de metabolòmica i lipidòmica i hem identificat, en pacients amb adrenomieloneuropatia, una signatura lipidòmica que es defineix per nivells alts de fosfolípids, glirerolípid, esfingolípid o esterols. A més, hem generat dos models de degeneració de motoneurona *in vivo* (peix zebra), *knock-out* de *plp1* i de *degs1*, que ens ajudaran a entendre millor la fisiopatologia d'aquestes malalties en humans. Els primers pacients d'una d'aquestes, el dèficit de *DGS1*, han estat diagnosticats i publicats pel nostre grup gràcies a aquest projecte.

## 2. Resultats obtinguts

### 1. Seqüenciació d'última generació (NGS) i anàlisi bioinformàtica

Hem **seqüenciat l'exoma complet** de 88 famílies amb malaltia de motoneurona sense diagnòstic, i s'ha arribat a un diagnòstic en 46, hem trobat 7 gens candidats

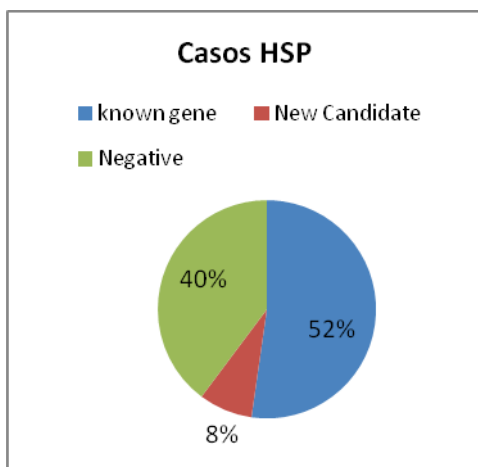
nous i en 35 famílies no hem trobat cap gen candidat. El rendiment diagnòstic molecular ha estat del 60%.

Dels casos diagnosticats, hem trobat 6 variants de canvi de marc de lectura (*frameshift*), 27 no sinònimes (*missense*), 3 delecions sense canvi de marc de lectura (*nonframeshift deletions*), 6 d'empalmament (*splicing*) i 4 de terminació prematura de la proteïna (*stop-gain*). D'aquestes variants, 25 no havien estat descrites prèviament. Hem realitzat **estudis de segregació** a totes les famílies en què hem trobat gens candidats a l'anàlisi de l'exoma. En total hem realitzat la validació per Sanger de 228 variants, que es corresponen a 128 gens diferents, en tots els membres de la família dels quals disposàvem de DNA. Per a l'avaluació i classificació de les variants hem seguit les directrius de l'American College of Medical Genetics (ACMG) i l'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). Segons aquestes directrius, hem identificat 24 variants patogèniques, 16 variants probablement patogèniques i 6 variants de significació desconeguda (VUS).

Hem realitzat **estudis de validació *in vitro*** en 8 gens:

CAPN1: *Western blot* i altres proves funcionals han confirmat aquest gen com a causant de la malaltia en el pacient en estudi.

GFAP: estudis de transfecció i microscòpia han confirmat aquest gen com a causant de la malaltia en el pacient en estudi.



SCN4A: assajos de transfecció de minigens (Fichou Y *et al.*, Transfusion, 2015, 55:1432-43) per avaluar l'existència d'anomalies d'empalmament han descartat aquest gen com a causant de la malaltia en el pacient en estudi.

SPG11: estudis de cDNA per confirmar si les mutacions estan en heterocigosi composta, en no disposar de DNA dels pares i tractar-se d'una mutació d'empalmament. Els estudis han confirmat

aquest gen com a causant de la malaltia en el pacient en estudi.

ERBB4: assajos de transfecció de minigens per avaluar l'existència d'anomalies d'empalmament, ja que aquest gen no s'expressa en sang ni fibroblasts. Les anàlisis han descartat aquest gen com a causant de la malaltia en el pacient en estudi.

PNKP: estudis de cDNA i assajos de transfecció de minigens per avaluar l'existència d'anomalies d'empalmament. Les anàlisis han descartat aquest gen com a causant de la malaltia en el pacient en estudi.

A més, estem realitzant estudis de validació en 2 casos de variants en gens no associats a malaltia fins ara. En un dels casos hem fet estudis de cDNA i, en col·laboració amb un grup d'Estrasburg, estem realitzant estudis de complementació en llevat. En l'altre cas estem fent estudis de clonatge i transfecció, així com altres estudis d'expressió de proteïna i efecte en el transport cel·lular a fibroblasts.

En 29 casos en els quals no s'ha arribat a cap diagnòstic amb la seqüenciació de l'exoma complet, hem seqüenciat el genoma complet. Actualment estem realitzant l'estudi bioinformàtic d'aquests casos, que presenta una gran complexitat degut a la ingent quantitat de dades que generen aquests estudis. Com en el cas de l'estudi de l'exoma, els gens candidats seran validats per Sanger, tot i que el projecte hagi finalitzat.

## **2. Caracterització metabòlica de gens implicats en malalties de motoneurona**

Per tal de buscar empremtes metabòliques indicatives de malaltia degenerativa de motoneurona, ens hem centrat en pacients d'una de les malalties més representatives de les que cursen amb degeneració de motoneurona, l'adrenoleucodistròfia lligada a X (X-ALD). La X-ALD és un trastorn neurometabòlic hereditari causat per mutacions en el gen *ABCD1* i caracteritzat per una progressiva paraplegia espàstica que afecta els tractes corticoespinals i cursa amb insuficiència adrenal. Estan descrits diferents fenotips dins de la X-ALD: a) adrenomièloneuropatia (AMN), que s'inicia en edat adulta, afecta principalment la medul·la espinal en forma de paraparèsia espàstica i no té caràcter inflamatori important; b) AMN cerebral (AMNc), pacients AMN que desenvolupen demència, desordres del comportament i presència de resposta inflamatòria en substància blanca; c) adrenoleucodistròfia cerebral infantil (ALDc), amb inici entre els 3 i els 10 anys d'edat i que es caracteritza per una resposta inflamatòria que causa desmielinització.

En aquesta part de l'estudi ens hem basat en els fenotips clínics que cursen amb paraparèsia espàstica, es a dir, AMN i AMNc. Hem utilitzat mostres de líquid cefalorraquidi (LCR) i hi hem aplicat mètodes de metabolòmica i lipidòmica basats en espectrometria de masses.

Per tal d'analitzar el perfil metabòlic característic de cada un dels fenotips estudiats hem fet una anàlisi multivariant on s'estudia la composició de metabòlits i específicament d'espècies lipídiques presents en aquestes mostres, per veure si es pot descriure un algoritme de diagnosi i, en cas positiu, quins serien els determinants moleculars principals. Inicialment hem aplicat una anàlisi de components principals, seguit d'una anàlisi d'agrupament jeràrquic. Aquestes proves han indicat que existeix una signatura lipidòmica comuna en pacients AMN i AMNc, que sembla definir-se per nivells més alts de fosfolípids, glicerolípids, esfingolípids o esterols. Amb el test d'ANOVA hem identificat 108 molècules diferencialment expressades i estadísticament significatives entre els grups. Posteriorment hem integrat els resultats obtinguts als estudis de metabolòmica i de lipidòmica, per realitzar una anàlisi d'enriquiment amb la finalitat de trobar noves vies metabòliques afectades. Hem identificat 5 ceramides augmentades en X-ALD. Les ceramides pertanyen a la família dels esfingolípids i són potents molècules de senyalització que intervenen en processos cel·lulars, tant fisiològics com fisiopatològics. Hi ha evidències de que l'acumulació aberrant de ceramides és neurotòxica i que intervé en la mort neuronal en malalties neurodegeneratives. A més, tots els glicerolípids identificats en aquest estudi estan augmentats a X-ALD. Aquests resultats reforcen la idea que el metabolisme lipídic juga un paper crucial en la neurodegeneració motora i ofereix bons candidats per a investigacions futures d'altres malalties de motoneurona.

### **3. Desenvolupament de models *in vivo* de degeneració de motoneurona**

Per validar la patogenicitat dels gens candidats hem utilitzat com a model el peix zebra, gràcies als avantatges que presenta per a l'anàlisi funcional.

En primer lloc, hem identificat gens candidats i hem fet estudis filogenètics per conèixer el nombre de gens ortòlegs al peix. Una vegada identificats els millors ortòlegs amb estudis de subfuncionalitat, hem analitzat els perfils d'expressió dels gens.

En segon lloc, hem dut a terme tres aproximacions funcionals consecutives segons els requeriments del gen candidat:

a) Generació de peixos amb pèrdua transitòria de funció del gen per injecció de Morpholino amb defecte de l'empalmament.

b) Generació de línies de peix zebra genoanul·lats (*knock-out*) estables utilitzant el sistema d'edició genòmica CRISPR/Cas9. Tot i que aquesta tècnica és molt interessant, diversos informes han demostrat que es produeixen compensacions gèniques en el cas de gens crucials per a l'organisme.

c) En els casos que la mutació del pacient dona lloc a un guany de funció del gen (GOF), hem injectat als embrions mRNA del gen en estudi.

Després de l'anàlisi de les mutacions trobades en els pacients, hem escollit els gens següents: *plp1b*, *pgm2*, *dync1*, *degs1* i *fus*. Després d'anàlisis preliminars de l'estructura gen/proteïna hem observat que algunes mutacions no causen fenotip, per la qual cosa hem centrat els nostres estudis en els gens *plp1b* i *degs1*.

D'acord amb els objectius de l'estudi, una vegada identificats els gens mutats en els pacients, hem seguit l'estratègia següent:

#### CLONACIÓ GÈNICA

- Gens de peix zebra pel perfil d'expressió (ISH)
- Gens humans per estudis de GOF

#### EXPERIMENTS FUNCIONALS

- LOF: CRISPR-Cas9/ Morpholinos
- Estudis de rescat/ no rescat
- Estudis de GOF: injecció de mRNA

#### ANÀLISI FENOTÍPIC

- Cèl·lules de Mauthner: 3A10
- Organització de les motoneurones:  $\alpha$ -Isl1
- Ramificació axonal:  $\alpha$ -znp
- Comportament

### 3.1. Estudis filogenètics

Un dels pacients presentava una mutació en el gen *PLP1*. Tot i que mutacions en *PLP1* poden produir tant HSP com esclerosi lateral amiotròfica (segons la localització de la mutació en el gen) i és un gen ben estudiat, es coneix poc quina és la seva participació en l'activitat mitocondrial i el seu efecte sobre el comportament locomotor associat a les diferents mutacions que provoquen HSP. Amb els estudis filogenètics hem trobat dos gens ortòlegs al peix zebra: *zplp1a* i *zplp1b*. Amb els estudis d'expressió

espaciotemporal del gen per RT-PCR i hibridació *in situ*, hem observat que *zplp1a* i *zplp1b* s'expressen durant l'embriogènesi i que *plp1b* és l'únic que s'expressa al territori d'interès (oligodendròcits). Aquest resultat seran publicats aquest any (Joya *et al.*, 2019, en preparació).

L'altre gen mutat en què ens hem concentrat és el *DEGS1*. La proteïna DEGS1 és un enzim amb activitat desaturasa que catalitza la conversió de dihidroceramida (DhCer) a ceramida (Cer), a la via de síntesi *de novo*. Els estudis filogenètics han demostrat un alt grau d'identitat entre el gen humà i el del peix zebra. En aquest cas, l'expressió del gen està enriquit a l'etapa de larvària a cervell i medul·la espinal, especialment a oligodendròcits.

### **3.2. Disseny de l'estratègia funcional, generació i caracterització dels peixos mutants**

En el cas del gen *PLP1*, hem dissenyat una estratègia CRISPR-Cas9 amb la finalitat de desactivar les diferents variants de *plp1b* presents al peix zebra.

En el cas del gen *DEGS1*, a causa de la complexitat de la proteïna, hem decidit desactivar el gen amb l'ús del Morpholino bloquejador de l'empalmament (MO-DEGS1 e2i2).

Els peixos han crescut en heterozigosi i hem realitzat cribratges de portadors. Posteriorment hem obtingut embrions creuant mascles amb femelles i els hem genotipat.

### **3.3. Cribratge fenotípic**

Hem dividit les anàlisis fenotípiques en les etapes següents:

- Efectes a les cèl·lules: cèl·lules de Mauthner (tinció 3A10), motoneurones (anti-Isl1), desenvolupament i connexió de les motoneurones axonals (anti-znp).
- Anàlisi del comportament locomotor espontani.
- Activitat mitocondrial basada en l'ús de Tg[UAS:mitoDsRed].

Els nostres estudis han demostrat que el model de peix zebra MO-DEGS1 presenta un augment de 10 vegades del quocient DhCer/Cer, un nombre reduït d'oligodendròcits (alteració de la mielinització) i discapacitat locomotora, consistent en el fenotip dels pacients. A més, hem demostrat també que el fàrmac FTY720 millora el fenotip del

peix. En col·laboració amb grups internacionals, hem aconseguit reunir 19 pacients amb mutacions a *DEGS1* que presenten un fenotip compatible amb els casos espanyols. La descripció dels pacients i els resultats obtinguts amb el peix han estat publicats recentment (Pant *et al.*, 2019, J Clin Invest). A hores d'ara hem començat un tractament d'ús compassiu amb FTY720 en alguns dels pacients diagnosticats.

### 3. Rellevància i possibles implicacions futures

Malgrat alguns exemples encoratjadors, un diagnòstic no sempre comporta un tractament. La realitat és que la majoria de malalties mendelianes conegudes no poden ser tractades amb èxit, com a mínim actualment. No obstant això, no es pot infravalorar la importància de rebre un diagnòstic específic i correcte, per a les famílies afectades. Els pacients amb paraparèsia espàstica requereixen sovint atenció a temps complet des de molt joves, la qual cosa suposa una càrrega molt difícil per a la família del pacient. És fascinant veure la dedicació i l'amor que mostren les famílies en la cura de persones amb dèficits neurològics complexos durant molts anys. Per a ells, el simple coneixement de l'explicació real de la malaltia pot proporcionar confort. El diagnòstic correcte també pot facilitar la prestació de serveis sanitaris i socials, i també un consell genètic adequats. Per descomptat, l'esperança és que conèixer el diagnòstic correcte també permetrà un enfocament més específic per a futures teràpies tan aviat es vagin descobrint. L'aplicació precoç de la seqüenciació d'última generació (NGS) pot acabar amb una "odissea diagnòstica" que sovint és tediosa, costosa i emocionalment esborronadora; per tots els motius esmentats anteriorment, l'ús d'NGS és simplement una bona pràctica mèdica. Hi ha poques àrees terapèutiques que es puguin beneficiar més d'aquest nou paradigma en la genètica clínica que els trastorns neurològics, especialment els que afecten els nens. Hi ha diverses raons interconnectades per a això: ja s'ha demostrat que moltes de les malalties neurològiques tenen una base genètica; sovint és difícil preveure el defecte genètic segons la clínica del pacient; s'estan descrivint noves variants causants setmanalment, i és costós i feixuc realitzar estudis gen per gen. A més, el cost global dels trastorns neurològics inexplicables és immens. L'NGS pot facilitar el diagnòstic molecular individualitzat en pacients i famílies amb malalties no diagnosticades fins ara i sense explicació.



El model de diagnosi tradicional per l'avaluació d'un individu amb un trastorn genètic putatiu inclou la formulació d'una hipòtesi diagnòstica que pot constar d'un ventall de possibilitats. Aquests possibles diagnòstics són provats a través d'una varietat d'anàlisis: bioquímiques (sang, orina, líquid cefalorraquidi), estructurals (RMN), funcionals (EEG) i de gens específics. Un estudi recent va examinar les implicacions econòmiques del diagnòstic basat en l'estudi de seqüències completes de l'exoma (WES) en el context de 500 pacients avaluats mitjançant proves genètiques tradicionals (Shashi V *et al.*, Genet Med. 2014 Feb;16:176-82). Aquest treball va demostrar que si el diagnòstic no és clínicament evident a la primera visita, la mitjana del cost per diagnòstic genètic realitzat amb proves tradicionals és aproximadament de 25.000 dòlars. El cost del WES, d'altra banda, actualment no arriba als 500 euros per mostra. Per tant, quan s'utilitza en un entorn adequat, el WES té el potencial de proporcionar un benefici de cost significatiu per al pressupost sanitari i per a la societat. Aquest projecte ha permès el diagnòstic per a 46 famílies que, amb els mètodes tradicionals, havien quedat sense diagnosticar. La implementació d'aquesta metodologia a les primeres etapes diagnòstiques hauria estalviat, a la sanitat pública, costos molt elevats. Amb aquesta finalitat s'està seguint un estudi col·laboratiu en el qual participen els principals hospitals de Catalunya i del qual forma part el nostre grup, finançat per la Generalitat, que finalitzarà a final del 2019 (Implementació de la medicina personalitzada basada en la genòmica en malalties minoritàries neurològiques no diagnosticades; SLT002/16/00174-PERIS).

#### 4. Bibliografia científica generada

##### **La Marató de TV3 figura en els agraïments**

Schlüter A, Vélez-Santamaría PV, Verdura E, Ruiz M, Fourcade S, Rodriguez-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 preparació.

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, Casanovas C, Pujol A.

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

En preparació.

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

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

2019. En preparació.

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 preparació.

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 premsa. IF: 10.840.

Casanovas 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 premsa. IF: 5.751.

Pant D, Dorboz I, Schlüter 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.