



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



NOVES FUNCIONS DELS GENS APOPTÒTICS EN EL DESENVOLUPAMENT I ESTRÈS DEL MIOCARDI

Daniel Sanchís Morales

Institut Recerca Biomèdica de Lleida

1. Resum

El funcionament del cor està influenciat per una xarxa de gens que actua durant el desenvolupament determinant el nombre correcte de cardiomiòcits, el seu creixement i maduració. En l'adult, la interrupció del subministrament d'oxigen i nutrients indueix a la mort del miocardi, la qual pot derivar en insuficiència cardíaca. Els gens apoptòtics van ser investigats com a dianes per prevenir la mort cel·lular, però actualment se sap que els gens que regulen l'apoptosi podrien ser importants per al correcte desenvolupament cardíac. Investigacions prèvies suggerien que (1) alguns gens apoptòtics, com les caspases executores i les nucleases, regulen el creixement i diferenciació del miocardi, i que (2) el manteniment de la integritat mitocondrial dels fibroblasts cardíacs, que generen la cicatriu fibrosa en un infart, fonamenta la seva elevada supervivència.

Basats en aquests fets, les nostres hipòtesis de partida eren que (1) les caspases 3 i 7 i les nucleases EndoG i Tatdn1 són necessàries per a la divisió correcta dels miòcits durant el desenvolupament, i que (2) els fibroblasts cardíacs utilitzen l'autofàgia en cas de manca de nutrients, com per exemple durant la isquèmia, per mantenir-se funcionals.

Per respondre a aquestes hipòtesis, ens vam plantejar com a objectius identificar els mecanismes moleculars pels quals les caspases tenen influència en la divisió i maduració dels miòcits, així com esbrinar si hi ha una possible associació entre els gens apoptòtics i la funció cardíaca. També vam voler identificar els mecanismes pels quals la nucleasa EndoG controla la divisió i el creixement cel·lular al cor, així com caracteritzar el rol de la nucleasa Tatdn1 al miocardi. D'altra banda, vam voler caracteritzar l'autofàgia als fibroblasts cardíacs en isquèmia i la seva rellevància per a l'activitat metabòlica d'aquestes cèl·lules.

La caracterització bioquímica del cor dels ratolins dels quals vam anul·lar els gens de les caspases executores 3 i 7 al miocardi indica que hi ha més inflamació, menys miòcits i que aquests són més grans que en ratolins normals. A més, vam fer un estudi genòmic GWAS (*genome-wide association study*) incloent-hi 11.500 persones a partir de bases de dades genètiques en què vam analitzar la possible associació entre la funció cardíaca i certs canvis en les seqüències de 20 gens apoptòtics, així com un

estudi agnòstic global. Aquest estudi ens va permetre confirmar l'associació d'alguns reguladors apoptòtics, com Bcl2, caspases 8 i 10, cFLIP (cFLAR), FADD i TATDN1, amb canvis en marcadors de la funció cardíaca en humans; però, a més, ens va permetre identificar altres gens potencialment rellevants per a la funció cardíaca i, inesperadament, un vincle entre gens associats amb la funció cardíaca (incloent-hi alguns gens apoptòtics) i el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer. Aquest grup de dades confirma la influència dels gens apoptòtics en el desenvolupament del cor i en la funció cardíaca i, a més, suggereixen que hi ha un vincle entre la funció cardíaca i la malaltia d'Alzheimer.

L'anàlisi molecular, bioquímica i cel·lular dels models de ratolins deficientes en les nucleases EndoG i Tatdn1, així com estudis realitzats en cardiomiòcits i altres cèl·lules en cultiu, van mostrar que la manca d'Endog tant *in vivo* com *in vitro* genera estrès oxidatiu que indueix canvis en la senyalització cel·lular que té com a resultat la hipertròfia dels miòcits i l'alentiment de la proliferació cel·lular, tant del miocardi com d'altres tipus cel·lulars, incloent-hi les cèl·lules tumorals. Així mateix, vam trobar que la manca del gen Tatdn1 en els ratolins genera un increment en el diàmetre ventricular i canvis en l'expressió de molts gens, la qual cosa suggereix que té una funció important en el transport tant intracel·lular com extracel·lular de proteïnes. En conjunt, aquestes dades confirmen un rol important d'EndoG i Tatdn1 en la biologia cardíaca, ja que afecten la mida i el nombre de miòcits, però també el rol d'EndoG en altres cèl·lules, incloent-ho alguns tumors, que implica el control de radicals lliures d'oxigen (ROS) i el transport de proteïnes.

La caracterització bioquímica i funcional dels fibroblasts cardíacs en condicions normals, d'isquèmia i d'estrès de reticle endoplasmàtic, ha implicat l'anàlisi de la respiració cel·lular, l'estudi de l'estat d'oxidació cel·lular, la quantificació de la capacitat de supervivència i proliferació, l'estudi de l'organització mitocondrial, així com la caracterització de l'expressió gènica i proteica en aquestes cèl·lules, en comparació amb fibroblasts de pulmó i pell en diverses situacions d'estrès cel·lular. Els resultats van descartar una funció important de l'autofàgia per a la supervivència dels fibroblasts cardíacs durant la isquèmia, però van mostrar que els fibroblasts cardíacs presenten característiques biològiques que els fan especialment capaços de sobreviure a pressions baixes d'oxigen i condicions que alteren la distribució del calci intracel·lular que impliquen una taxa més alta de consum d'oxigen, més cadenes respiratòries per

mitochondri, nivells elevats de ROS, però millor control d'aquests en situacions d'estrès, entre d'altres. La via de senyalització STAT3 es troba particularment activada i regula tant la supervivència com l'expressió de proteïnes protectores en aquests fibroblasts. Aquest bloc de dades aporta nova informació sobre la biologia dels fibroblasts cardíacs i la seva elevada capacitat de supervivència.

En resum, els resultats obtinguts confirmen la implicació dels gens apoptòtics en el desenvolupament i funció del miocardi i demostren que alguns d'aquests gens estan regulant processos de creixement i proliferació dels miòcits mitjançant la implicació del control dels nivells de radicals lliures d'oxigen, les vies d'inflamació i el control en el transport de proteïnes. Així mateix, aportem noves dades sobre els fibroblasts cardíacs que permeten comprendre millor com funcionen aquests cèl·lules importants en processos de resposta a situacions d'estrès al cor. Finalment, les dades obtingudes suggereixen que alguns dels gens importants per a la funció cardíaca, incloent-hi gens apoptòtics, són també rellevants i, per tant, possibles dianes en la malaltia d'Alzheimer i alguns tipus de càncer.

2. Resultats

Tasca 1. Funcions dels executors apoptòtics caspases 3 i 7, i nucleasas EndoG i TatD en el desenvolupament del cor

- Hi ha un increment de citocines proinflamatòries al miocardi per manca de les caspases executores 3 i 7 específicament en aquest teixit al ratolí.
- La manca d'EndoG als cardiomiòcits de rosegador indueix a un increment de l'abundància de radicals lliures d'oxigen (ROS), i la inhibició d'aquests amb N-acetil-cisteïna és capaç de frenar la hipertròfia derivada de la manca d'aquest gen.
- La manca d'EndoG en cèl·lules somàtiques de rosegador i humanes en divisió n'alenteix la proliferació, que es pot recuperar mitjançant l'afegiment de detoxificadors de ROS.

- La manca d'EndoG és capaç de frenar, *in vitro* i *in vivo*, el creixement de tumors deficients en el supressor tumoral PTEN en models de ratolí i en línies cel·lulars tumorals humanes.
- EndoG regula la via de senyalització cel·lular Akt/GSK3/beta-catenina a través del control dels nivells de ROS amb impacte en el creixement i divisió cel·lular.
- Les nostres dades suggereixen que Tatdn1, tot i haver estat identificada com a nucleasa a partir d'experiments utilitzant models de sobreexpressió, no està implicada en el tall d'ADN, almenys al miocardi i al cervell, ja que (1) es troba al citoplasma cel·lular i no es transloca a nucli ni a mitocondris en cap situació d'estrès estudiada, (2) extractes cel·lulars enriquits en aquesta proteïna no mostren activitat nucleasa *in vitro* i (3) el patró de gens alterats al miocardi (i al cervell) de ratolins deficients en tatdn1 indica una funció d'aquest gen en el transport de proteïnes i no en la biologia dels àcids nucleics.
- La manca de tatdn1 *in vivo* en ratolí indueix a un increment del diàmetre del ventricle esquerre tant en sístole com en diàstole, cosa que suggereix que aquest gen té un paper en la hipertròfia i funció cardíaca.

Tasca 2. Fibroblasts cardíacs: autofàgia, el seu paper en la funció durant l'estrès i el paper de Bcl-2

- L'autofàgia és important per a la supervivència dels fibroblasts de qualsevol origen en condicions normals, ja que la seva inhibició per mètodes genètics (silenciament dels gens Atg7 o Bnip3) o farmacològics (3-metil adenina o cloroquina) indueix a mort cel·lular. Malgrat això, l'autofàgia no sembla tenir influència en la supervivència dels fibroblasts cardíacs durant la isquèmia i tampoc sembla que la manca del gen Bcl2 tingui influència en el flux autofàgic en aquestes cèl·lules.
- Els fibroblasts cardíacs de rata mostren un consum més alt d'oxigen, més abundància de cadenes respiratòries per mitocondri i una xarxa mitocondrial una mica més fragmentada en condicions normals que altres tipus de fibroblasts.

- Els fibroblasts cardíacs presenten més abundància de ROS i d'enzims detoxificadors de ROS com l'Mn-superòxid dismutasa (SOD2) i la catalasa que altres tipus de fibroblasts en condicions normals i els regulen millor en isquèmia.
- Els fibroblasts cardíacs tenen un estat d'activació especialment elevat de la via de senyalització STAT3 que influencia la seva capacitat de supervivència en condicions d'estrès cel·lular i que controla l'expressió de proteïnes com els enzims detoxificadors de ROS i Bcl2, que protegeix els mitocondris en condicions d'isquèmia.

Tasca 3. Estudis d'associació de tot el genoma (GWAS) per identificar nous loci que es van utilitzar per estudiar l'associació potencial de gens de senyalització cel·lular i apoptosi amb fenotips relacionats amb la funció cardíaca del cor humà

- Dels 20 gens amb funcions reguladores de l'apoptosi que es van analitzar en 11.500 genomes humans, vam identificar una associació estadísticament significativa d'alguns polimorfismes amb algun tret relacionat amb la funció cardíaca per als gens BCL2, cFLIP (cFLAR), FADD, caspasa-8, caspasa-10 i TATDN1.
- A més, l'estudi genòmic no dirigit (agnòstic) va identificar nous polimorfismes en altres gens que es troben associats amb la funció cardíaca que es poden consultar a les bases de dades <https://data.mendeley.com/> i <https://doi.org/10.17632/22j djghnsp.1>.
- De manera totalment inesperada, la comparació de polimorfismes associats amb la funció cardíaca i amb el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer va permetre identificar un grup de gens que es troben associats amb els dos trets, inclosos alguns d'apoptòtics, cosa que suggereix que hi pot haver un vincle potencial entre funció cardiovascular i la malaltia d'Alzheimer que pretenem continuar estudiant.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

El projecte titulat "Noves funcions dels gens apoptòtics en el desenvolupament i estrès del miocardi" es va dissenyar amb l'objectiu primari de confirmar o descartar la implicació de diversos gens apoptòtics en la biologia i el comportament del miocardi davant estímuls nocius, d'identificar els mecanismes intracel·lulars implicats i de

caracteritzar els mecanismes que confereixen als fibroblasts cardíacs un avantatge de supervivència en situacions d'estrès com la isquèmia. El projecte, per tant, es caracteritzava per un perfil d'investigació bàsica preclínica que servís de base per millorar la comprensió dels fonaments bioquímics i moleculars que governen la funció del cor i la seva resposta a l'estrès. La finalitat era trobar possibles dianes útils en el diagnòstic o tractament tant d'anomalies de la funció cardíaca com en la millora de la condició cardíaca en situacions patològiques.

Les dades generades per la nostra feina mostren que, efectivament, hi ha gens que s'havien descobert i estudiat en l'àmbit de la mort cel·lular per apoptosi que, de fet, tenen un paper important en el desenvolupament i en la biologia del miocardi, que aquestes funcions no tenen relació amb la mort cel·lular i que principalment hi influeixen el nombre i la mida dels cardiomiòcits i estan relacionats amb la funció cardíaca. A més, mostrem que els fibroblasts cardíacs estan evolutivament preparats per subsistir a pressions baixes d'oxigen i tenen una sèrie de mecanismes moleculars que els fan resistents a situacions d'estrès cel·lular. Per això, els resultats derivats del projecte proposen noves dianes moleculars que haurien de permetre una millor comprensió dels fonaments biològics subjacents a la hipertròfia cardíaca, els processos de remodelatge cardíac després d'un infart, el seu possible tractament i els fonaments genètics determinants de la funció del cor.

A més, i de manera inesperada, les nostres dades estableixen un vincle genètic entre funció cardíaca i malaltia d'Alzheimer i identifiquen Endog com un nou gen implicat en la progressió tumoral. Per tant, es poden utilitzar aquestes dades per dissenyar noves eines diagnòstiques i terapèutiques en l'àmbit de les malalties del cor, les malalties neurodegeneratives i alguns tipus de càncer.

4. Bibliografia científica generada

Comunicacions a congressos

Barés G, Blasco N, Beà A, Girón C, Llovera M, Sanchis D.

Paralog mitochondrial nucleases ExoG and EndoG have similar roles in cell proliferation but divergent distribution and different impact on apoptosis.

P19r-51. XL Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, octubre del 2017.

Beà A, Blasco N, Barés G, Martínez M, Vila M, Girón C, Comella J, Llovera M, Sanchis D. *Deciphering the molecular signaling that confers high resistance to ischemia in cardiac fibroblasts.*

P19r-47. XL Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, octubre del 2017.

Barés G, Blasco N, Beà A, Girón C, Llovera M, Sanchis D.

EndoG regulates cell cycle progression through a ROS dependent mechanism.

42.º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, juliol del 2019.

Beà A, Barés G, Martínez M, Vila M, Cámara Y, Girón C, Comella JX, Martí R, Llovera M, Sanchis D.

Cardiac fibroblasts have high basal ROS abundance and electron transport chain activity compared to fibroblasts of other tissues.

42.º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, juliol del 2019.

Publicacions

Blasco N, Cámara Y, Núñez E, Beà A, Barés G, Forné C, Ruíz-Meana M, Girón C, Barba I, García-Arumí E, García-Dorado D, Vázquez J, Martí R, Llovera M, Sanchis D.*

Cardiomyocyte hypertrophy induced by Endonuclease G deficiency requires reactive oxygen radicals accumulation and is inhibitable by the micropeptide humanin.

Redox Biology. 2018 Jun;16:146-156. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.021.

* Autor per a correspondència.

Sáez ME, González-Pérez A, Hernández-Olasagarre B, Beà A, Moreno-Grau S, de Rojas I, Monté-Rubio G, Orellana A, Valero S, Comella JX, Sanchis D,* Ruiz A.*

Genome Wide Meta-Analysis identifies common genetic signatures shared by heart function and Alzheimer's disease.

Scientific Reports. 2019 Nov 13;9(1):16665. doi: 10.1038/s41598-019-52724-2.

* Autors per a correspondència.

En preparació

Blasco N,¹ Beà A,¹ Barés G, Girón C, Navarides R, López-Lluch G, Dolcet X, Llovera M, Sanchis D.*

EndoG contributes to the regulation of cell proliferation through the control of reactive oxygen species.

Article en preparació.

¹ La contribució dels autors ha estat igual.

* Autor per a correspondència.

Beà A, Girón C, Llovera M,* Sanchis D.*

STAT3 constitutive activation sustains a set of biological functions conferring survival advantage to heart fibroblasts.

Article en preparació.

* Autors per a correspondència.

Bases de dades

Les bases de dades <https://data.mendeley.com/> i <https://doi.org/10.17632/22jdjghnsp.1>.

Tesis doctorals

Autora: Natividad Blasco Angulo (membre de l'equip del projecte).

Director: Daniel Sanchis.

Títol: *EndoG influeix en el creixement i proliferació cel·lular amb impacte en el desenvolupament dels teixits i la progressió tumoral.*

Data i qualificació: 22/09/2017, excel·lent *cum laude*.

Autora: Gisel Barés Junqué (membre de l'equip del projecte).

Directors: Daniel Sanchis i Marta Llovera.

Títol: *Estudi de les funcions no apoptòtiques de les nucleases ExoG i TatD.*

Data i qualificació: en fase de redacció (data prevista de defensa: juny-juliol 2020).

Autora: Aida Beà Tàrrega (contractada a través del projecte de La Marató de TV3).

Directors: Daniel Sanchis i Marta Llovera.

Títol: *Identificació dels fonaments moleculars que confereixen elevada capacitat de supervivència als fibroblasts cardíacs.*

Data i qualificació: en fase de redacció (data prevista de defensa: juny-juliol 2020).