



ASOCIACIÓN SÚPER AUTÉNTICOS

[www.asociacionsuperautenticos.org](http://www.asociacionsuperautenticos.org)

[info@asociacionsuperautenticos.org](mailto:info@asociacionsuperautenticos.org)

Telf. 628 721 840



ASOCIACIÓN KAT6A Y AMIGOS

[www.kat6a-spain.es](http://www.kat6a-spain.es)

[Kat6ayamigos@gmail.com](mailto:Kat6ayamigos@gmail.com)

Telf. 665 467 956

## MITOCURE – KAT6A

Las mutaciones en varios genes implicados en la regulación epigenética de la expresión génica han sido vinculados a diferentes síndromes de Discapacidad Intelectual, incluyendo las alteraciones del gen de la lisina-acetiltransferasa en el síndrome **KAT6A**. La mayoría de las características clínicas en el síndrome de **KAT6A** tienen una penetración muy variable. Las características básicas son discapacidad intelectual, retraso del habla, microcefalia, anomalías cardíacas y complicaciones gastrointestinales.

En este proyecto se propone evaluar la efectividad terapéutica de los distintos tratamientos que actúan a nivel mitocondrial en los fibroblastos derivados de los pacientes y en células neuronales generadas por reprogramación directa.

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.

Por todo ello, las Asociaciones KAT6A y amigos y Súper Auténticos han decidido aunar esfuerzos apostando por la **Investigación**, ofreciendo así a los pacientes la **Oportunidad** de mejorar su calidad de vida.

*“Cuando eliges la esperanza, todo es posible”*



## MITOCURE-KAT6A:

NUEVAS DIANAS TERAPEUTICAS PERSONALIZADAS  
PARA EL SINDROME KAT6A



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**

## INTRODUCCIÓN

La Discapacidad intelectual (DI) o retraso global en el desarrollo (RGD) ocurre en 1%–3% de todos los niños. Variaciones en el número de copias de los genes y mutaciones raras (a menudo ligadas al cromosoma X o autosómicas recesivas) explican hasta el 25% de todos los casos. Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva del ADN, han surgido numerosas mutaciones monogénicas heterocigotas como la causa principal de diferentes síndromes de discapacidad intelectual y son responsables de hasta al 40% de las mutaciones graves de DI (1, 2). Las mutaciones en varios genes implicados en la regulación epigenética de la expresión génica han sido vinculados a diferentes síndromes de DI incluyendo las alteraciones del gen de la lisina-acetiltransferasa en el síndrome KAT6A (3).

La Lisina-acetiltransferasa 6 A (KAT6A) pertenece a la familia MYST de histonas acetiltransferasas que se definen por la presencia de un dominio altamente conservado MYST que consiste en un motivo de unión a acetil-CoA y un dedo de zinc (4). La familia de proteínas MYST (KAT6A, KAT6B, KAT5 y KAT7) participan en una amplia gama de funciones celulares centrales, como la remodelación de la cromatina, la regulación génica, la traducción de proteínas, el metabolismo y replicación celular (5).

La mayoría de las características clínicas en el síndrome de KAT6A tienen una penetración muy variable. Las características básicas son discapacidad intelectual, retraso del habla, microcefalia, anomalías cardíacas y complicaciones gastrointestinales (6).

Hipótesis recientes (Dr. Richard I. Kelley, Kennedy Krieger Institute, Department of Pediatrics, Johns Hopkins Medical Institutions, <http://mitomedical.com/research/>) señalan que las mutaciones en el gen KAT6A afecta de forma secundaria a la función mitocondrial y que fármacos que actúan a nivel mitocondrial (como la carnitina y la vitamina B5) son capaces de revertir los fenotipos clínicos de la enfermedad.

En este proyecto proponemos evaluar la efectividad terapéutica de los distintos tratamientos que actúan a nivel mitocondrial en los fibroblastos derivados de los pacientes 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 generados 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.

### 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 (7). 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 (8).

### 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  $\gamma$  (9). 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*) (10). 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 (11). La AMPK estimula una cascada de señalización que promueve la glicolisis 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) (12). 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 (13, 14). Aunque la autofagia es un proceso general en la célula, algunos autores sugieren que la activación de la autofagia es necesaria para la mitofagia (15). 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 con afectación mitocondrial que cursan con una autofagia/mitofagia alterada (16). 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) (17). PGC-1 $\alpha$  es directamente fosforilado y transactivado por AMPK (18). 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 (19). 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 (20). 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 (Manganese Superoxide Dismutase) y la catalasa (21). 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 (22). De acuerdo con nuestros datos, (i) la activación inadecuada de la AMPK induce un fenotipo más grave en las mutaciones de los genes que codifican por los ARN de transferencia mitocondriales (mt-tRNA) (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 (23) y en otras enfermedades asociadas con disfunción mitocondrial como la fibromialgia (24).

**mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) como objetivo terapéutico.** 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 (25).

**Mitofagia y biogénesis mitocondrial.** Las enfermedades mitocondriales manifiestan disfunción mitocondrial y activación de la mitofagia (26, 27). 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

**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 optica 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) (28, 29). Estos procesos opuestos de fusión/fisión determinan la organización y funcionamiento de la red mitocondrial de la célula (30). Tanto la dinámica mitocondrial como la mitofagia desempeñan un papel esencial en la función mitocondrial y el recambio de las mitocondrias disfuncionales (31). 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 (32). Por todo ello, la modulación de la dinámica mitocondrial puede ser otra estrategia para modificar la heteroplasma. Así, se ha demostrado que la fisión mitocondrial previene del aumento de la heteroplasma en modelos celulares de las enfermedades mitocondriales. Por el contrario, el silenciamiento de Drp-1 produce un aumento del porcentaje de heteroplasma (33). 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 (34, 35). Además de la producción de citocinas pro-inflamatorias, 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 (36). 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 (37) y además, se ha demostrado que la autofagia está estrechamente relacionada con la inflamación (38). 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 (39).

## Hipótesis

Nuestra hipótesis propone que el tratamiento personalizado in vitro de los fibroblastos y células neuronales derivados de los pacientes KAT6A 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 KAT6A.
- 2) Cribado de fármacos en los fibroblastos derivados de los pacientes KAT6A. 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 KAT6A.
- 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 KAT6A.** 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 2 líneas de fibroblastos derivados de pacientes KAT6A.

**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 la proteína mutada.

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>

- 1) **Cribado de fármacos en los fibroblastos derivados de los pacientes**

**KAT6A. 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 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 KAT6A.

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 los fibroblastos. 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.

## **2) 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 (40-43). Utilizaremos vectores lentivirales que contienen factores de transcripción específicos del linaje neural. Los fibroblastos derivados de los pacientes se incubarán 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 los fibroblastos será reemplazado por un medio de diferenciación neuronal complementado con factores de crecimiento específicos neuronales. 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. (44). 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).

**PRESUPUESTO: (duración 3 años)**

**CONCEPTOS**

Cultivos Celulares  
Anticuerpos & Western blotting  
Reactivos Biología Molecular  
Ensayos de Bioquímica  
Gastos personal

**TOTAL PROYECTO.....42.000€ anuales x 3 años**

**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. Gilissen, C., Hehir-Kwa, J. Y., Thung, D. T., van de Vorst, M., van Bon, B. W., Willemsen, M. H., Kwint, M., Janssen, I. M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Tearle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H. G., de Vries, B. B., Kleefstra, T., Brunner, H. G., Vissers, L. E., and Veltman, J. A. (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* **511**, 344-347
2. Moeschler, J. B., Shevell, M., and Committee on, G. (2014) Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics* **134**, e903-918
3. Fahrner, J. A., and Bjornsson, H. T. (2014) Mendelian disorders of the epigenetic machinery: tipping the balance of chromatin states. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**, 269-293
4. Avvakumov, N., and Cote, J. (2007) The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* **26**, 5395-5407
5. Voss, A. K., Collin, C., Dixon, M. P., and Thomas, T. (2009) Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity. *Developmental cell* **17**, 674-686
6. Kennedy, J., Goudie, D., Blair, E., Chandler, K., Joss, S., McKay, V., Green, A., Armstrong, R., Lees, M., Kamien, B., Hopper, B., Tan, T. Y., Yap, P., Stark, Z., Okamoto, N., Miyake, N., Matsumoto, N., Macnamara, E., Murphy, J. L., McCormick, E., Hakonarson, H., Falk, M. J., Li, D., Blackburn, P., Klee, E., Babovic-Vuksanovic, D., Schelley, S., Hudgins, L., Kant, S., Isidor, B., Cogne, B., Bradbury, K., Williams, M., Patel, C., Heussler, H., Duff-Farrier, C., Lakeman, P., Scurr, I., Kini, U., Elting, M., Reijnders, M., Schuurs-Hoeijmakers, J., Wafik, M., Blomhoff, A., Ruivenkamp, C. A. L., Nibbeling, E., Dingemans, A. J. M., Douine, E. D., Nelson, S. F., Study, D. D. D., Arboleda, V. A., and Newbury-Ecob, R. (2018) KAT6A Syndrome: genotype-phenotype correlation in 76 patients with pathogenic KAT6A variants. *Genet Med*
7. Parikh, S., Saneto, R., Falk, M. J., Anselm, I., Cohen, B. H., Haas, R., and Medicine Society, T. M. (2009) A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Current treatment options in neurology* **11**, 414-430
8. El-Hattab, A. W., Zarante, A. M., Almannai, M., and Scaglia, F. (2017) Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Molecular genetics and metabolism* **122**, 1-9
9. Hardie, D. G. (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* **144**, 5179-5183
10. Luo, Z., Saha, A. K., Xiang, X., and Ruderman, N. B. (2005) AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* **26**, 69-76
11. Hardie, D. G. (2013) AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes* **62**, 2164-2172
12. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., and Shaw, R. J. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**, 214-226
13. Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., and Shaw, R. J. (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456-461
14. Roach, P. J. (2011) AMPK -> ULK1 -> autophagy. *Mol Cell Biol* **31**, 3082-3084
15. Gilkerson, R. W., De Vries, R. L. A., Lebot, P., Wikstrom, J. D., Torgykes, E., Shirihai, O. S., Przedborski, S., and Schon, E. A. (2012) Mitochondrial autophagy in cells with

## MITOCURE-KAT6A

- mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition. *Hum Mol Genet* **21**, 978-990
16. Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., Schon, E. A., Lamperti, C., and Zeviani, M. (2011) In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$  axis. *Cell Metab* **14**, 80-90
  17. Hawley, D. G. H., Fiona, A. R., and Simon, A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 251-262
  18. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B. M. (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**, 12017-12022
  19. Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056-1060
  20. Wenz, T., Diaz, F., Spiegelman, B. M., and Moraes, C. T. (2008) Activation of the PPAR/PGC-1 $\alpha$  pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab* **8**, 249-256
  21. Li, X.-N., Song, J., Zhang, L., LeMaire, S. A., Hou, X., Zhang, C., Coselli, J. S., Chen, L., Wang, X. L., Zhang, Y., and Shen, Y. H. (2009) Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes* **58**, 2246-2257
  22. Garrido-Maraver, J., Paz, M. V., Cordero, M. D., Bautista-Lorite, J., Oropesa-Avila, M., de la Mata, M., Pavon, A. D., de Lavera, I., Alcocer-Gomez, E., Galan, F., Ybot Gonzalez, P., Cotan, D., Jackson, S., and Sanchez-Alcazar, J. A. (2015) Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. *Biochimica et biophysica acta* **1852**, 2535-2553
  23. Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2012) AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing research reviews* **11**, 230-241
  24. Alcocer-Gomez, E., Garrido-Maraver, J., Bullon, P., Marin-Aguilar, F., Cotan, D., Carrion, A. M., Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Sanchez-Alcazar, J. A., Battino, M., and Cordero, M. D. (2015) Metformin and caloric restriction induce an AMPK-dependent restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia patients. *Biochimica et biophysica acta* **1852**, 1257-1267
  25. Johnson, S. C., Yanos, M. E., Kayser, E.-B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., Uhde, L., Hui, J., Wall, V. Z., Gagnidze, A., Oh, K., Wasko, B. M., Ramos, F. J., Palmiter, R. D., Rabinovitch, P. S., Morgan, P. G., Sedensky, M. M., and Kaerberlein, M. (2013) mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* **342**, 1524-1528
  26. Cotan, D., Cordero, M. D., Garrido-Maraver, J., Oropesa-Avila, M., Rodriguez-Hernandez, A., Gomez Izquierdo, L., De la Mata, M., De Miguel, M., Lorite, J. B., Infante, E. R., Jackson, S., Navas, P., and Sanchez-Alcazar, J. A. (2011) Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J* **25**, 2669-2687
  27. de la Mata, M., Garrido-Maraver, J., Cotãjn, D., Cordero, M. D., Oropesa-ãvila, M., Izquierdo, L. G., de Miguel, M., Lorite, J. B., Infante, E. R., Ybot, P., Jackson, S., and Sánchez-Alcázar, J. A. (2012) Recovery of MERRF Fibroblasts and Cybrids Pathophysiology by Coenzyme Q10. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **9**, 446-463
  28. Chan, D. C. (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241-1252

## MITOCURE-KAT6A

29. Chen, H., and Chan, D. C. (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **18**, R169-176
30. Twig, G., and Shirihai, O. S. (2011) The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1939-1951
31. Westermann, B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 872-884
32. Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., and Shirihai, O. S. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433-446
33. Malena, A., Loro, E., Di Re, M., Holt, I. J., and Vergani, L. (2009) Inhibition of mitochondrial fission favours mutant over wild-type mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* **18**, 3407-3416
34. Sagulenko, V., Thygesen, S. J., Sester, D. P., Idris, A., Cridland, J. A., Vajjhala, P. R., Roberts, T. L., Schroder, K., Vince, J. E., Hill, J. M., Silke, J., and Stacey, K. J. (2013) AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell death and differentiation* **20**, 1149-1160
35. Vanaja, S. K., Rathinam, V. A., and Fitzgerald, K. A. (2015) Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology* **25**, 308-315
36. Miao, E. A., Rajan, J. V., and Aderem, A. (2011) Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews* **243**, 206-214
37. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221-225
38. Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews* **13**, 722-737
39. Cordero, M. D., Alcocer-Gomez, E., Marin-Aguilar, F., Rybkina, T., Cotan, D., Perez-Pulido, A., Alvarez-Suarez, J. M., Battino, M., Sanchez-Alcazar, J. A., Carrion, A. M., Culic, O., Navarro-Pando, J. M., and 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*
40. Drouin-Ouellet, J., Lau, S., Brattas, P. L., Rylander Ottosson, D., Piracs, K., Grassi, D. A., Collins, L. M., Vuono, R., Andersson Sjolander, A., Westergren-Thorsson, G., Graff, C., Minthon, L., Toresson, H., Barker, R. A., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2017) REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO molecular medicine* **9**, 1117-1131
41. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Bjorklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and 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**, 10343-10348
42. Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D. A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., Bjorklund, A., Grealish, S., and 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**, 7038-7043
43. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041
44. Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* **4**, 67-73