



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**AHK2: Duchenne gihar-distrofian
potentzial terapeutikoa duen
kalstabina modulatzailer berria**

*Haizpea Lasa Fernandez,
Laura González Lafuente,
Jose Alberto Navarro García,
Jaione Lasa Elgarresta, Aitziber
Irastorza, Jose Ignacio Miranda,
Jesus Maria Aizpurua, Adolfo López
de Munain, Gema Ruiz Hurtado
eta Ainara Vallejo Illarramendi*

166-171 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.21>



AHK2: Duchenne gihar-distrofian potentzial terapeutikoa duen kalstabina modulatzailerria

Lasa Fernandez, Haizpea^{1,2,3}; González Lafuente, Laura⁴; Navarro García, Jose Alberto⁴; Lasa Elgarresta, Jaione^{1,2}; Irastorza, Aitziber⁵; Miranda, Jose Ignacio⁵; Aizpurua, Jesus Maria⁵; López de Munain, Adolfo^{1,2,3,6}; Ruiz Hurtado, Gema⁴ eta Vallejo Illarramendi, Ainara^{1,2,7}

¹ Neurozientzia Saila, Biodonostia Osasun Ikerketa Institutua, Donostia; ² CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Madril; ³ Neurozientzia Saila, EHU, Leioa; ⁴ Cardioresnal translational laboratory, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madril; ⁵ Kimika Fakultatea, EHU, Donostia; ⁶ Neurologia Saila, Donostiako Ospitalea, Donostia; ⁷ Pediatria Saila, EHU, Donostia

haizpea.lasa@ehu.eus

Laburpena

Duchenne gihar-distrofia (DMD) ikertzeko erabiltzen diren mdx saguak 12 astez tratatu dira AHK2 izeneko molekula berriarekin eta konposatu honek bihotzean duen eragina aztertu da. Batetik, elektrokardiogramak egin zaizkie saguei eta, bestetik, bihotzeko zelulak isolatu eta kardiomiozito hauetan kaltzioarekin lotutako hainbat ezaugarri aztertu dira mikroskopia konfokalean. Lan honetan AHK2-ak nitrosilazio zein fosforilazioak eraldatutako rianodina-hartzaileen funtzioa berrezartzen duela ikusi da, kaltzio txinparta edo spark-en jaitsiera esanguratsua eragiten baitu. Gainera, tratamenduak bihotzaren funtzioa hobetzen duela dirudi, elektrokardiograma bidez sagu gaixoen QTc tarteak, bihotzak birpolarizatzeko behar duen denbora, laburtzen duela ikusi baita.

Hitz gakoak: Duchenne gihar-distrofia, bihotza, mdx, kaltzioa, rianodina-hartzailea, kalstabina.

Abstract

Mdx mice, the most used animal model to research Duchenne muscular dystrophy, were treated for 12 weeks with the novel compound AHK to focus on its effect in the heart. With this aim, heart functionality was analyzed by electrocardiography and, also, cardiomyocytes were isolated from treated mice in order to study the effect on calcium handling by confocal microscopy. In this work it has been shown that AHK2 can modulate the function of the nitrosylated and phosphorylated ryanodine receptor, since it reduces the calcium spark frequency significantly. Moreover, it seems that the treatment improves heart function, decreasing QTc length, time to repolarize during a heartbeat.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, heart, mdx, calcium, ryanodine receptor, calstabin.

1. Sarrera eta momentuko egoera

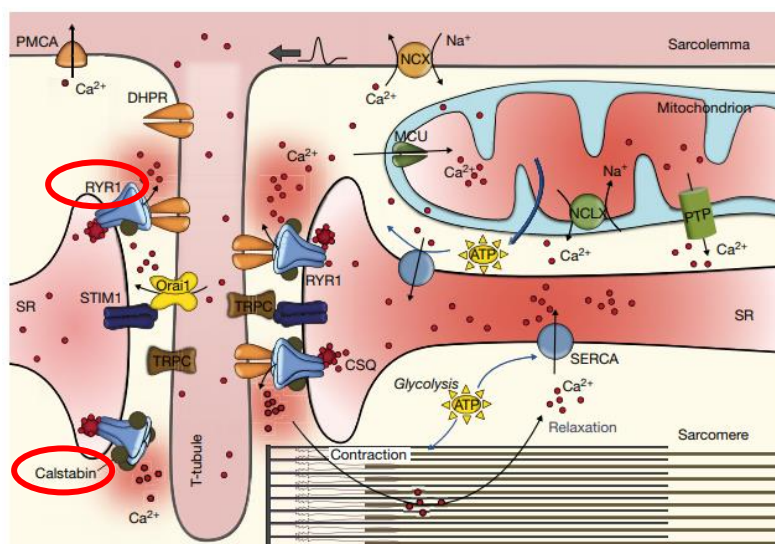
Duchenne gihar-distrofia (DMD) haurtzaroan gehien diagnostikatzen den distrofia muskular mota da eta, batez beste, 3500 mutiletik batek pairatuko du, X kromosoman dagoen distrofina geneko mutazio ezberdinak izanik gaixotasun honen erantzuleak. Distrofina proteina funtzionalik ez izateak giharren mekanismoan eragiten du. Izan ere, proteina honek funtzio estrukturala du, aktina filamentuak zelulaz kanpoko mintzarekin lotuz, gihar-zuntzen arteko loturak egonkortzen ditu. Beraz, distrofinarik gabe fibrosia emango da, hots, giharreko zelulak hil eta ehun konektibo zein gantzatsuak hartuko du euren tokia, giharraren funtzioa galduz (World Duchenne Organization, 2019).

Gaur egun sendabiderik ez duen distrofia-mota honetan, sintomak pixkanaka azaleratzen dira bi eta sei urteren artean, eta, endekatze-prozesu progresiboaren ondorioz nerabegarorako gurpildun aulkiaren premia dute. Gaixotasun honen ezaugarri nagusia gihar eskeletikoko atrofia

den arren, bihotzean ere arazoak dituzte eta gehienetan arnas-aparatuko huts batek eragiten du gaixoen heriotza 20-30 urteren artean, diafragma oso kaltetuta dutelako.

Ikerketa lerro nagusiak DMD gaixoen organismoan, gene-terapia bidez, distrofina genearen kopia zuzen bat txertatzera bideratuta daude. Dena den, terapia zehatz bat diseinatu beharko litzateke mutazio bakoitzeko. Beste estrategia bat distrofinaren gabeziak sortzen dituen kalteei aurre egitea da. Besteak beste, DMD gaixotasunean kaltzioaren kanalak diren rianodina-hartzaileek (RyR) fosforilazioak eta nitrosilazioak dituztela deskribatuta dago, distrofina ezak sortutako ROS eta NOS erradikal askeen eraginez (Bellinger et al., 2009). Eraldaketa hauek RyR-aren konformazio estrukturala aldatzen dute (Nikolaienko et al., 2018) eta, ondorioz, kalstabina, kaltzio-kanalak konformazio itxian mantentzeaz arduratzen den proteina, ezin da hartzailera behar bezala lotu. Honela, kaltzioa kontrolik gabe eta modu esporadikoan irteten da erretikulu sarkoplasmatikotik. RyR kanalek ezinbesteko funtzioa dute giharren uzkurdu-erlaxazio prozesuan, seinale elektrokimikoa iristean kaltzioa askatzen baitute sarkolemara eta ioi honek miosina-aktina bidezko uzkurdu aktibatzen du (Vallejo-Illarramendi et al., 2014).

1. irudia. Kaltzioaren seinalizazio-dinamika gihar-zuntzetan (Vallejo-Illarramendi et al., 2014).



Duchenne gihar-distrofia RyR kanala farmako bidez modulatzeko lehen ahaleginak Marks-en taldeak egin ditu, S107 eta ARM210 molekulekin, eta, emaitza esanguratsuak eskuratu dituzten arren (Bellinger et al., 2009; Capogrosso et al. 2018), toxikotasun arazoak direla medio, ez da fase klinikora pasatu. Honen harira, Aizpurua doktoreak gidaturiko EHUKo Kimika Saileko Katalisi jasangarria unitateak RyR itu duen AHK2 izeneko molekula sortu du. Zehazki AHK2 molekula kalstabina proteina modulatzeko diseinatu da eta honek, besteak beste, itzulpen ondorengo aldaketak dituzten RyR kanalak konformazio itxian mantentzen ditu.

2. Ikerketaren helburuak

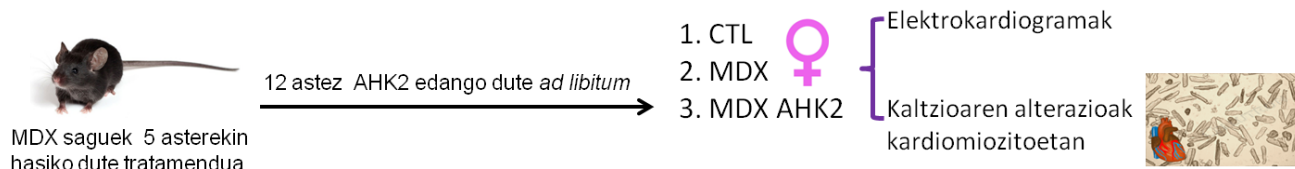
Ikerketa lan honetan AHK2 molekulak DMD gaixoen bihotzetan kaltetuta dauden hainbat aldagai hobetzen dituen aztertu da. Horretarako, 12 asteko tratamenduak egin dira hilabete bateko mdx saguetan, Duchenne gihar-distrofia ikertzeko gehien erabiltzen den animalia-ereduan alegia. Bi izan dira helburu nagusiak:

- 1) *In vivo* eginiko elektrokardiogramen bidez bihotzaren funtzionamendua aztertu da.
- 2) *In vitro*, mikroskopia konfokala eta estimulazio elektrikoa erabiliz, saguen bihotzeko zelulak, kardiomiotozitoak, isolatu eta kaltzioarekin lotutako fisiologia ikertu da.

3. Ikerketaren muina

Bihotzaren funtzioa ikertzeko lau hilabeteko mdx sagu emeak, distrofina genean mutazioa dutenak, eta kontrolak (ctl) erabili dira hiru taldeetan banatuta. AHK2-a edarian jarri zaie, 30mg/kg-eguneko dosian.

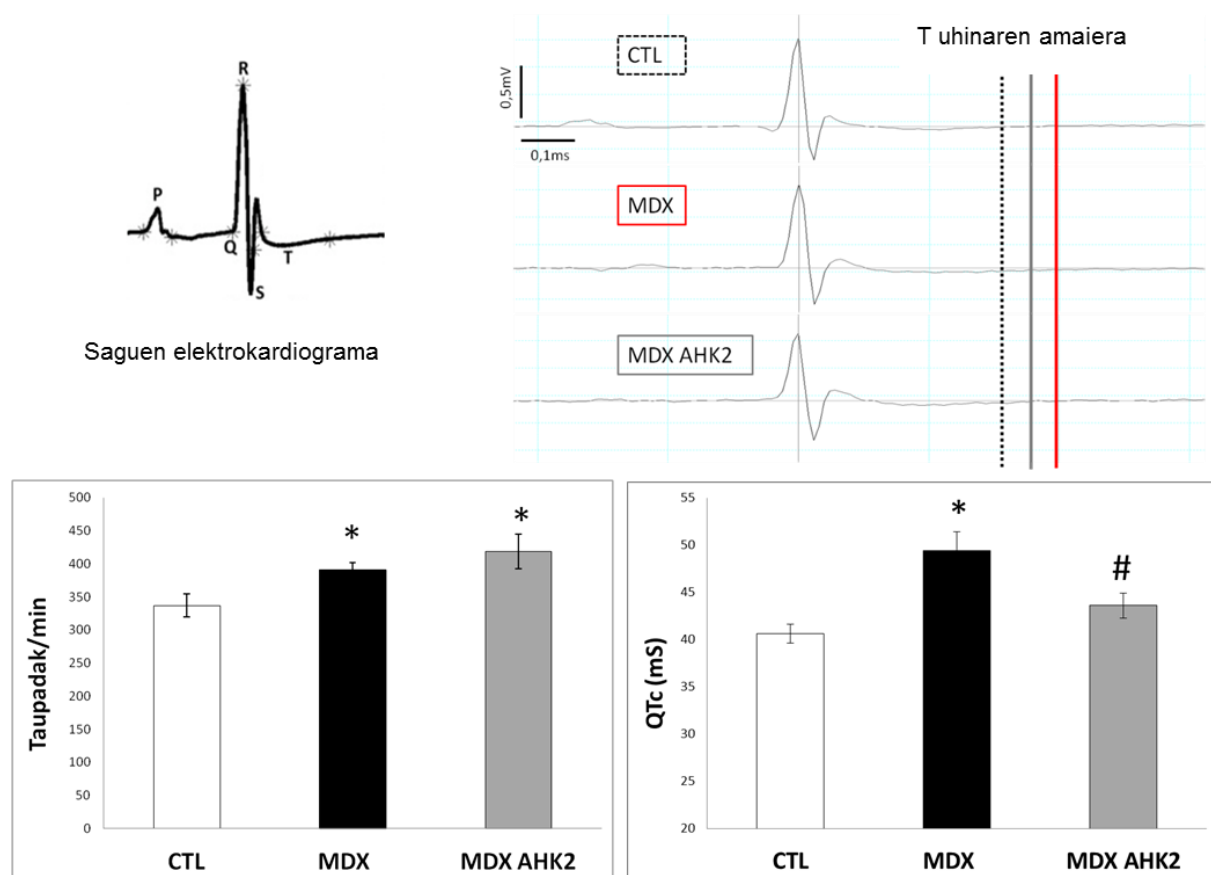
2.irudia. Ikerketaren diseinua.



3.1. Elektrokardiogramak

Bihotzaren funtzioa *in vivo* ikertzeko elektrokardiogramak (EKG) egin dira. Horretarako, saguak %1.5 isoflurano gasarekin anestesiatu ondoren, buruz behera jarri dira sentsoare metalikoan 37°C-tara berotuta dagoen animalia txikien fisiologia monitorizatzeko sistemako plataforman (Harvard Apparatus, Holliston, MA, AEB) eta hankak gel eroalearekin estali dira konexio elektriko egokia ziurtatzeko (Navarro et al., 2019). EKG erregistroak LabChart 7.0.-ko fitxategi bitarretara bihurtu eta software hau erabiliz sagu bakoitzeko aurreneko 5 minutuetako emaitzak aztertu dira (ADInstruments, Sydney, Australia).

3.irudia. Elektrokardiogrametako emaitzak.



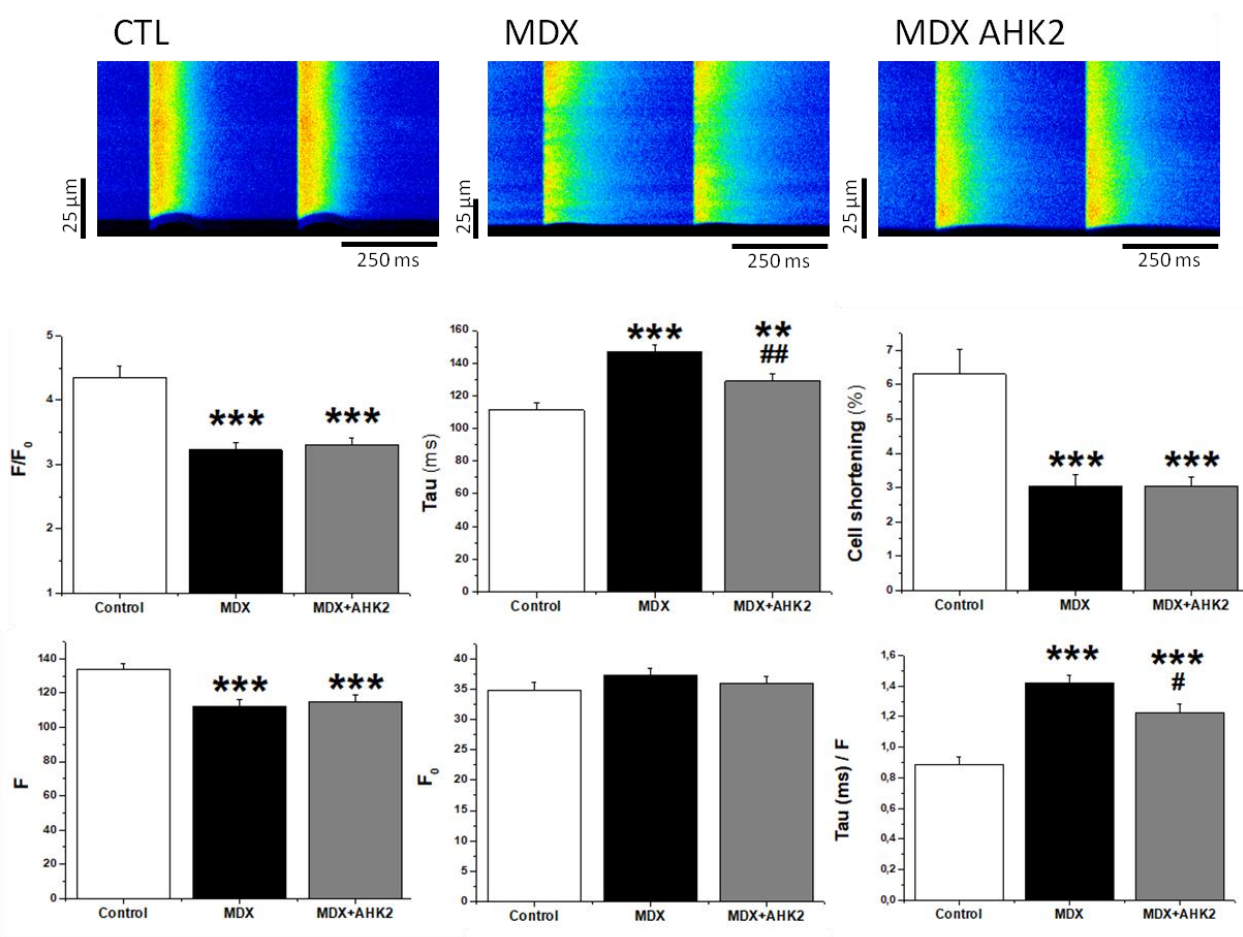
Bihotz-taupaden frekuentzia altuagoa da mdx saguetan eta QTc tarte, taupada baten ondoren bihotzak birpolarizatzeko behar duen denbora, luzeagoa da (3. irudia), aurrez deskribatu zuten bezala (Fauconnier, 2010). Tratamenduak bihotz-taupaden frekuentzia aldatzen ez badu ere, QTc tarte laburtzen du.

3.2. Kaltzioaren alterazioak kardiomiozitoetan

Saguak pentobarbitala (100mg/kg i.p.) injektatuta anestesiatu dira eta jarraian heparina xiringatu zaie (4 UI/g i.p.). Bihotza atera eta, berehala, aorta kanulatu da; ondoren, Langendorff bidez kolagenasa II-arekin (Worthington, Lakewood, NJ, AEB) bentrikulua perfunditu eta kardiomiozitoak isolatu dira Shioyak argitaratutako protokoloa jarraituz (Shioya, 2007). Kaltzioaren alterazioak aztertzeko kardiomiozitoak mintza iragazten duen zunda fluoreszentearekin, Fluo-3AM (5mmol/L), kargatu dira (Navarro et al., 2019). Mikroskopia konfokalean (Meta Zeiss LSM 710, 40x) eskuratu dira irudiak eta IDL softwarea erabili da kuantifikazioarako (Research System Inc., Boulder, CO, AEB).

Batetik, kaltzioaren trantsitorio zitosolikoak aztertu dira sistolean, kardiomiozitoak bi elektrodoekin 2 Hz-ra estimulatuta. Estimulazio bidez uzkurdua eragiten da (cell shortening), eta, honela, erretikulu sarkoplasmatikotik kaltzioa atera eta sartzen duten kanalen egoera, RyR eta SERCA hurrenez hurren, zein den jakin daiteke. Fluoreszentziaren balio maximoa (F) fluoreszentzia basalarekin (F₀) normalizatu da ratioa lortzeko (F/F₀), eta erorketaren denbora (Tau) kaltzioaren jaitsieraren malda da.

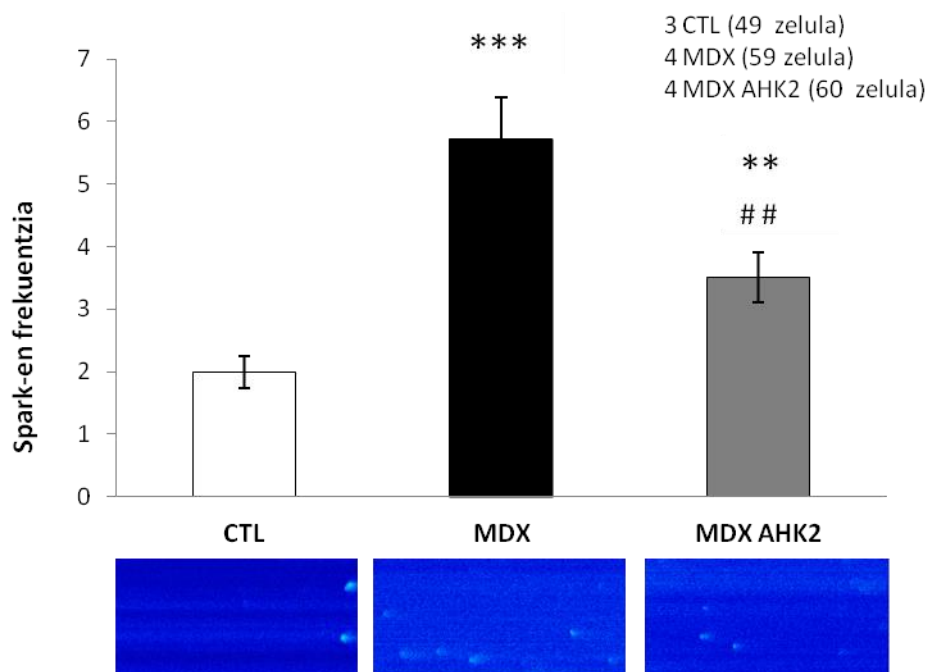
4. irudia. Kaltzioaren mugimendu zitosolikoak sistolean, hots, kardiomiozitoak estimulazio elektrikoan.



Mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio gutxiago askatzen dute erretikulutik (F/F₀), eta AHK2 molekulak ez du eraginik ioi honen liberazioan estimulu elektriko baten ondoren (4. irudia). Dena den, tratamenduak sagu gaixoen zelulek handituta duten Tau kurba txikiagotzen du, hau da, SERCA bidezko kaltzioaren birjasotzean eragin zuzena du AHK2-ak.

Bestetik, spark edo kaltzio-irteera espontaneoak grabatu dira. Diastolean ateratzen diren kaltzio-txinparta hauen erantzuleak gaizki itxitako RyR kanalak dira, eta hau da, hain justu, AHK molekularen jomuga.

5. irudia. Kaltzio spark-en frekuentzia diastolean, hots, kardiomiozitoak estimatu gabe.



Espero bezala, mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio-txinparta (spark) gehiago dituzte (5. irudia), RyR kanala ez baitago ondo itxita fosforilazioak eta nitrosilazioak direla eta. Gainera, AHK2-ak eragin zuzena duela ikusi da RyR kanala ixten, izan ere tratatutako zelulek spark gutxiago dituzte, %59,4ko berreskuratzearekin (Gillis eta Carlson, 2008).

Ematzen estatistika-analisiak Origin softwarea erabiliz egin dira, 2 faktoreko ANOVA eta analisi unibariatuarekin; honela, $p < 0,05$ esangura-maila ezarri da, * vs CTL, # vs MDX.

4. Ondorioak

Ikerketa honetan, AHK2-aren mekanismoa kalstabinari batu eta rianodina-hartzaileak modulatzeko dela baieztatu da, spark edo kaltzio irteera espontaneoak kontrolatzen baititu. Farmako bezala funtzionatu dezaken molekula honen itua baieztatzearekin batera, bihotzaren funtzioa hobetzen duela dirudi, gaixoetan luzeagoa den bihotzaren birpolarizazio denbora jaisten du eta.

Honela, AHK2-ak Duchenne gihar-distrofia potentzial terapeutikoa izan dezake tratamendu konbinatorio gisa erabilita. Esan bezala, molekula honek ez du distrofinaren gabezia ordezkatuko, baina gabezia honek sortutako hainbat kalte hobetu ditzakeela uste da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

AHK2 molekulak bere ituan duen eragin zuzena aztertu ondoren, gaur egun gehien erabiltzen diren farmakoekin terapia konbinatu bat egitea litzateke hurrengo urratsa. Terapia hau mdx saguetan probatzeaz gain, Duchenne gihar-distrofia ikertzeko erabili ohi diren beste animalia-ereduekin lan egitea ere ezinbestekoa da entsegu-klinikoekin hasteko.

6. Erreferentziak

- Bellinger, A. M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., ... Marks, A. R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nature Medicine*, 15(3), 325–330. <https://doi.org/10.1038/nm.1916>
- Capogrosso, R. F., Mantuano, P., Uaesoontrachoon, K., Cozzoli, A., Giustino, A., Dow, T., ... De Luca, A. (2018). Ryanodine channel complex stabilizer compound S48168/ARM210 as a disease modifier in dystrophin-deficient mdx mice: Proof-of-concept study and independent validation of efficacy. *FASEB Journal*, 32(2), 1025–1043. <https://doi.org/10.1096/fj.201700182RRR>
- Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., ... Lacampagne, A. (2010). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1559–1564. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908540107>
- Gillis, J., & Carlson, G. (2008). TREAT-NMD protocol: The recovery score to evaluate therapy efficiency in NMD: a common, quantitative and comparative scoring system., (Id), 1–6.
- Navarro-García, J.A., Delgado C., Fernández-Velasco M., Val-Blasco A., Rodríguez-Sánchez E., Aceves-Ripoll J., ... Ruilope, L. M. and Ruiz-Hurtado G. (2019). Fibroblast growth factor-23 promotes rhythm alterations and contractile dysfunction in adult ventricular cardiomyocytes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy392>
- Nikolaienko, R., Bovo, E. and Zima, A. V. (2018). Redox Dependent Modifications of Ryanodine Receptor: Basic Mechanisms and Implications in Heart Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01775>
- Shioya, T. (2007). A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. *The Journal of Physiological Sciences*, 57(6), 327–335. <https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP010107>
- Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G. and López de Munain, A. (2014). Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 16(October), e16. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.17>
- World Duchenne Organization (2019). [<https://worldduchenne.org/>]

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Euskal Herriko Unibertsitateko Euskara Errektoreordetzako Ikertzaileak Prestatzeko Doktoretza-aurreko bekari (2015eko deialdia) eta unibertsitate bereko mugikortasun laguntzari esker burutu da Madrileko Hospital 12 de Octubre-ko Gema Ruiz Hurtadoren laborategian.