

Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de la enfermedad rara NEDAMSS

Introducción

NEDAMSS (desorden del neurodesarrollo con regresión, movimientos anormales, pérdida del habla y epilepsia) es una enfermedad rara causada por mutaciones en heterocigosis del gen IRF2BPL (OMIM 618088). Este gen se expresa en numerosos tejidos, incluyendo el sistema nervioso. En 2008, se describe 7 pacientes con NEDAMSS que presentan mutaciones *de novo* tipo *missense* (cambio de aminoácido) y otros *nonsense* (stop prematuro) ¹. Las mutaciones *missense* se asocian a sintomatología menos severa, comparadas con la *nonsense*.

A pesar de haberse desarrollado varios modelos animales de NEDAMSS, la función de IRF2BPL no está del todo clara. La eliminación del gen ortólogo en *Drosophila* (*pits*) es letal y la inactivación parcial causa neurodegeneración ¹. La reprogramación de fibroblastos de pacientes a astrocitos ha demostrado que las proteínas truncadas de IRF2BPL secuestran a la silvestre en el citoplasma e impiden su entrada al núcleo, demostrando su efecto dominante negativo ². Estos resultados se recapitulan *in vivo*, ya que la expresión de formas truncadas de IRF2BPL en *Drosophila* también inducen neurodegeneración ². Por otro lado, un estudio más reciente ha demostrado en modelos de pez cebra y de *Drosophila* que la pérdida en homocigosis de *pits* e *irf2bpl*, respectivamente, desencadena una pérdida de neuronas. Además, se demuestra que la pérdida de *irf2bpl* desencadena la inducción de la señal WNT, que es la responsable directa de la muerte de las neuronas ³. Los pacientes de NEDAMSS también tienen mayor actividad WNT y su inactivación farmacológica en larvas de pez cebra deficientes en *Irf2bpl* reduce la muerte de las neuronas ³.

Objetivos

El presente proyecto pretende desarrollar modelos de pez cebra deficientes en *Irf2bpl* así como que sobreexpresen las variantes de los pacientes (Tabla 1) con el fin de determinar la patogenicidad de las mismas e identificar fármacos que puedan reposicionarse para tratar esta enfermedad

Los objetivos concretos son:

1. Desarrollar un modelo en pez cebra de pérdida de función de *irf2bpl*.
2. Expresar las diferentes variantes de los pacientes en larvas de pez cebra silvestres y deficientes en *Irf2bpl* para estudiar su patogenicidad.
3. Escrutinio de librería de fármacos aprobados por la FDA/EMA en los modelos de NEDAMSS anteriormente desarrollados.
4. Comprensión de los mecanismos moleculares implicados en NEDAMSS.

5. Estudio del efecto de los fármacos más relevantes identificados en modelos de organoides de cerebro humano a través de colaboraciones con otros investigadores.

Tabla 1. Variantes de IRF2BPL en estudio

P1_IRF2BPL	Y173*	Nonsense
P2_IRF2BPL	R391H	Missense
P3_IRF2BPL	W569*	Nonsense
P4_IRF2BPL	L713Sfs*54	Frameshift
P5_IRF2BPL	C718Afs*49	Frameshift
P6_IRF2BPL	N701Tfs*66	Frameshift

Planificación y desarrollo

El proyecto se realizará en la Universidad de Murcia, el Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Pascual Parrilla y el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca como se resumen en la Figura 1.

Tarea 1.1. (meses 1-6) Mutación con CRISPR-Cas9 de *irf2bpl* en larvas de pez cebra y análisis de fenotipo.

Tarea 1.2. (meses 1-18) Obtención de líneas estables deficientes en *irf2bpl* tanto en homo como herterocigosis y su caracterización fenotípica y molecular.

Tarea 2.1. (meses 1-12) Expresión transitoria de variantes de IRF2BPL de los pacientes en larvas de pez cebra y análisis de fenotipo.

Tarea 3.1. (meses 13-18) Escrutinio de fármacos a gran escala para la identificación de nuevos tratamientos.

Tarea 4.1. (meses 7-18) Estudio del mecanismo molecular implicado en NEDAMSS en los modelos desarrollados.

Tarea 5.1. (meses 19-24) Confirmar efecto de los fármacos identificados en modelos de organoides en colaboración con otros investigadores.

Tarea 5.2 (meses 22-24) Solicitud medicamento huérfano a través de CIBERER.

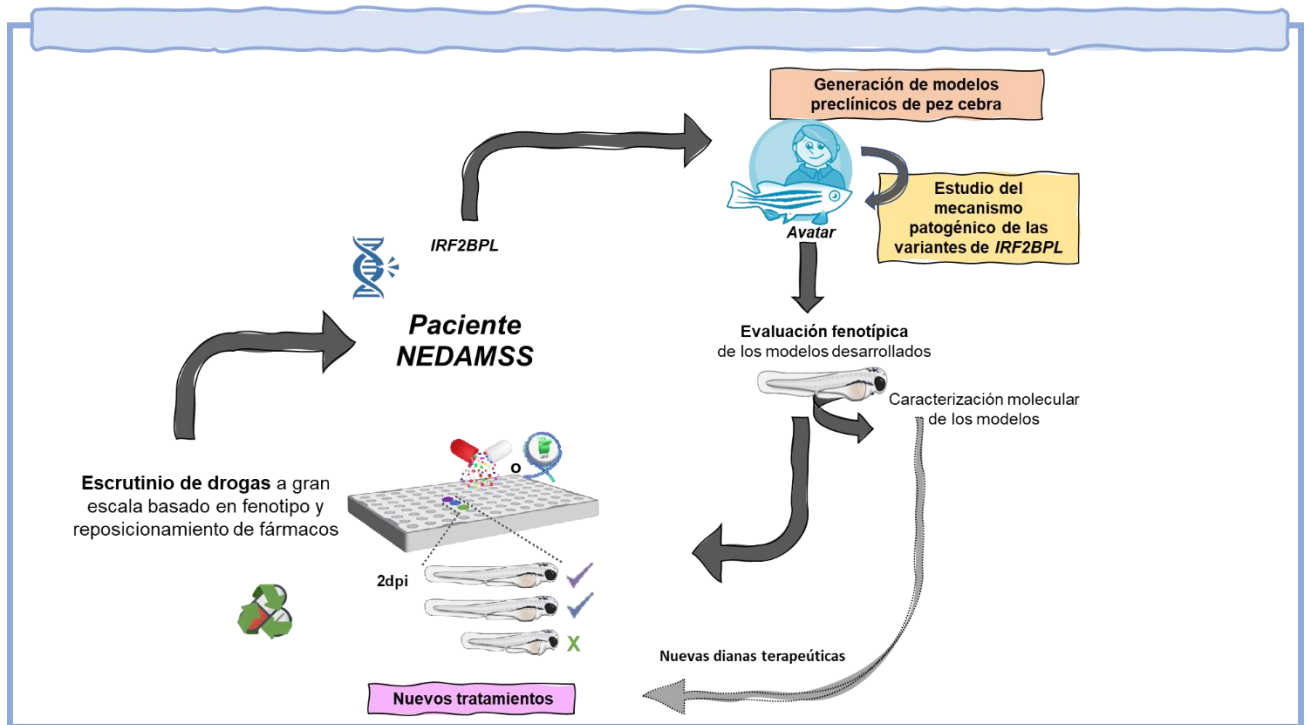


Figura 1: Esquema y planificación del trabajo.

Equipo de investigación



El grupo de investigación es multidisciplinar y traslacional con un claro valor añadido. El proyecto no podría ser llevado a cabo sin la participación de todos ellos, que es requerida en las diferentes fases secuenciales del proyecto, como se detalla en las tareas planificadas. Los investigadores directamente involucrados en el proyecto son expertos en generación de modelos animales mediante transgénesis y edición del genoma con CRISPR-Cas9 (Dra. García Moreno) y modelos de enfermedades raras en pez cebra (Dr. García Moreno, Dr. Mulero Méndez, Dra. Cabas, Dra. Martínez López y Dra Tyrkalska).

Además, contamos con 2 técnicos de laboratorio: Pedro J. Martínez Agulló e Inmaculada Fuentes Martínez.

Contamos con varios laboratorios equipados con microscopios de campo claro y fluorescencia, lupa de fluorescencia, algunas de ellas con placas motorizadas para escrutinios, incubadores, microtomos, ultramicrotomos y criostato, sistema automatizados de inclusión de muestras para histología, espectrofotómetros, luminómetros, lectores ELISA, sistema de documentación de geles, cubetas para electroforesis de DNA y proteínas, sistemas de transferencia, centrífugas refrigeradas con rotores herméticos para evitar generación de aerosoles, cabinas de flujo laminar de nivel I y II, campanas extractoras de gases, termocicladores, microinyectores, autoclave, congeladores de -80C, etc. Además, el IMIB y la UMU cuenta con varias plataformas que dan apoyo excepcional a los grupos de investigación, entre ellas Animalarios, Biobanco, Servicio de Bioinformática, Servicio de Cultivo de Tejidos, Servicio de Secuenciación, PCR a tiempo real, FACS, microscopía confocal y electrónica, NMR, HPLC, etc., todos asistidos por técnicos de alta cualificación (http://www.imib.es/portal/plataformas/plataformas_imib.jsf y <http://www.um.es/sai/>). Además, estamos integrados en CIBERER, la mayor plataforma de investigaciones en enfermedades raras de España. CIBERER tiene gran experiencia en solicitud de medicamentos huérfanos y ellos desarrollos necesarios para llevar los fármacos a la clínica.

Bibliografía

- 1 Marcogliese, P. C. *et al.* IRF2BPL Is Associated with Neurological Phenotypes. *Am J Hum Genet* **103**, 245-260, doi:10.1016/j.ajhg.2018.07.006 (2018).
- 2 Sinha Ray, S. *et al.* Mechanisms of IRF2BPL-related disorders and identification of a potential therapeutic strategy. *Cell Rep* **41**, 111751, doi:10.1016/j.celrep.2022.111751 (2022).
- 3 Marcogliese, P. C. *et al.* Loss of IRF2BPL impairs neuronal maintenance through excess Wnt signaling. *Sci Adv* **8**, eab15613, doi:10.1126/sciadv.ab15613 (2022).

