



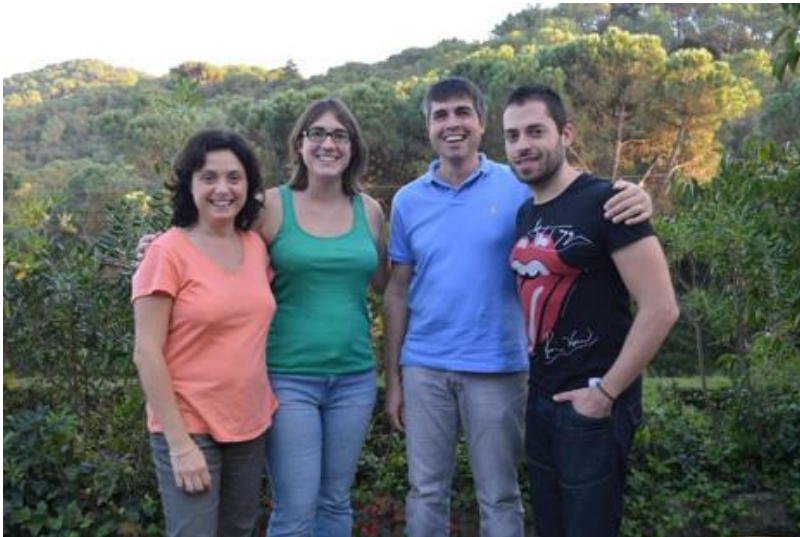
## REGENERACIÓN DE CIRCUITOS NEURONALES MEDIANTE MARCAPASOS OPTOGENÉTICOS

**Artur Llobet Berenguer**

Facultat de Medicina CSUB

**Pau Gorostiza Langa**

Institut de Bioenginyeria de Catalunya IBEC



## 1. Resumen del proyecto

Las lesiones traumáticas adquiridas del sistema nervioso central provocan daños irreversibles, conduciendo a una disminución dramática en la calidad de vida de los individuos afectados. El impacto de estas lesiones puede ser muy marcado si las capas claves en el procesamiento de la información se ven dañadas, a pesar de que una gran parte de los circuitos neuronales afectados permanezcan intactos. El objetivo del proyecto era fijar las bases de un nuevo enfoque farmacológico, buscando realizar una prueba de principio basándonos en la optogenética y la fotofarmacología (medicamentos regulados por la luz). La finalidad era mantener artificialmente la actividad de un circuito neuronal lesionado iluminando selectivamente las neuronas no dañadas expresando moléculas optogenéticas como channelrhodopsin-2, o aplicando fármacos que actuaran como ligandos fotoconmutables (PTL). Después de la absorción de fotones, estas moléculas cambian el potencial de membrana y, por tanto, pueden ejercer de marcapasos de la actividad neuronal, emulando artificialmente la acción de las sinapsis dañadas y manteniendo los circuitos operativos.

Nuestra hipótesis fue que estas condiciones facilitarían la restauración de las funciones nerviosas, probándose *in vivo* en renacuajos de *Xenopus tropicalis*. Esta especie presenta muchas ventajas: pequeño tamaño, rápidas posibilidades experimentales, un genoma secuenciado con muchos genes conservados en los seres humanos, es genéticamente modificable y posee características regenerativas bien establecidas en su sistema nervioso central. Se plantearon tres objetivos específicos: 1) establecimiento de nuevos PTL, 2) generación de líneas transgénicas que expresasen moléculas optogenéticas en el sistema nervioso central de *Xenopus tropicalis*, y, 3) estudio del efecto en la regeneración nerviosa de marcapasos ópticos expresados en neuronas no dañadas, fuera mediante optogenética o PTL. Como resultado, el proyecto ha logrado: 1) crear nuevos PTL capaces de controlar la actividad celular/neuronal, 2) utilizar líneas transgénicas de *Xenopus tropicalis* para visualizar el curso temporal de la reforma de una vía nerviosa *in vivo*, 3) identificar factores que promueven el correcto recableado de la conectividad nerviosa después de una lesión, y 4) aplicar PTL con éxito para controlar las funciones neuronales. Los resultados preliminares sugieren como una contribución beneficiosa mantener un circuito dañado activo a través de la utilización de PTL.

En resumen, nuestros datos apoyan la aplicabilidad de PTL en el sistema nervioso, ya que mediante la luz podemos conseguir un control exquisito de la actividad del fármaco. Los renacuajos de *X. tropicalis* han demostrado ser una excelente plataforma de cribado en ensayos de alto rendimiento, previamente al uso de los modelos animales mamíferos. El proyecto fue desarrollado por los grupos de investigación dirigidos por el Dr. Artur Llobet (coordinador) en el Instituto de Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) y por el Dr. Pau Gorostiza en el Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC).

## 2. Resultados

Los esfuerzos coordinados de los dos grupos de investigación que participan en el proyecto han permitido la obtención de una amplia gama de resultados, que van desde los que se pueden considerar esencialmente como técnicos hasta hallazgos con un claro componente traslacional. La primera parte del proyecto fue principalmente de carácter metodológico, ya que requería el desarrollo de técnicas que cinco años atrás eran completamente un reto. La segunda mitad del proyecto ilustra la aplicabilidad de las metodologías desarrolladas. Los resultados obtenidos establecen las bases de las investigaciones que en la actualidad se están llevando a cabo en nuestros grupos de investigación.

Queremos señalar que el proyecto estaba destinado a combinar la optogenética con el trabajo con renacuajos de *Xenopus tropicalis*, que son un organismo modelo emergente. Se han producido cambios espectaculares en estos campos de investigación durante el período 2010-2015, y creemos que el trabajo realizado ha contribuido de forma significativa a su desarrollo. Hemos evidenciado por primera vez la aplicación de una nueva gama de moléculas reguladas por la luz para ejercer un control sobre la actividad neuronal y el comportamiento en animales vivos.

Durante la primera mitad del proyecto, los esfuerzos se focalizaron en el establecimiento de métodos. El grupo del Dr. Gorostiza trabajó en el desarrollo de nuevos ligandos fotoconmutables (PTL). Estos compuestos muestran una actividad farmacológica que puede ser modulada por la luz. Por ejemplo, bajo la luz azul un fármaco puede estar inactivo y en presencia de la luz verde, activo. De este modo

es posible *encender* y *apagar* la actividad de una determinada molécula. El enfoque fue desarrollado para: 1) péptidos que interfieren en el proceso de endocitosis, que se llamaron Traffic-Light Peptides, y 2) un modulador alostérico del receptor de glutamato mGluR5, denominado Alloswitch-1.

En el mismo período, el grupo del Dr. Llobet trabajó en el establecimiento de líneas transgénicas de *X. tropicalis*. El objetivo era la identificación de promotores capaces de etiquetar subpoblaciones neuronales en la vía olfativa mediante el uso de moléculas fluorescentes genéticamente codificadas (como por ejemplo, GFP). Las neuronas olfativas se encuentran ubicadas dorsalmente y son muy accesibles a todo tipo de experimentos *in vivo*. La transparencia de los renacuajos permite observar fácilmente las neuronas con muy poca invasividad. A través de un promotor de 10 Kb del gen *Lhx2* fue posible etiquetar un grupo de neuronas sensoriales olfativas y células mitrales, que son, respectivamente, las responsables de transmitir y recibir información en el bulbo olfativo. El siguiente paso debía ser el uso de la optogenética, como por ejemplo emplear ChR2 bajo el promotor *Lhx2*. ChR2 es un canal iónico de membrana que se abre en presencia de la luz azul. Como resultado, las neuronas se activarían en presencia de luz azul.

Debido al curso del proyecto, este tipo de experimentos no se realizaron, ya que los PTL estaban dando unos resultados muy prometedores *in vitro*. Como el tiempo necesario para el establecimiento de una línea transgénica de *X. tropicalis* es de 8-12 meses, decidimos focalizarnos en los experimentos basados en el uso de los PTL en animales *wild-type*, evitando centrarnos en la optogenética. Por tanto, trasladamos todos nuestros esfuerzos a los trabajos sobre optofarmacología, que consiste en la aplicación directa de los compuestos sin necesidad de manipulación genética. Seguimos con la modificación genética de *X. tropicalis*, pero dando prioridad a la generación de animales que expresan indicadores fluorescentes en poblaciones neuronales. De esta manera, el proyecto se focalizó en: 1) usar PTL para controlar la actividad neuronal, y 2) emplear renacuajos que expresan marcadores fluorescentes para evaluar la regeneración de las conexiones neuronales.

Obtuvimos un gran éxito cuando fuimos capaces de controlar el movimiento de los renacuajos utilizando Alloswitch-1. Después de la exposición al fármaco, la

movilidad de los animales se convirtió en dependiente de la luz. En presencia de luz verde, los renacuajos dejaban de nadar, pero bajo luz azul volvían a moverse normalmente. Esta fue la primera demostración de que un determinado comportamiento puede cambiarse externamente. En nuestro caso era específico de la actividad del receptor metabotrópico de glutamato, mGluR5, cuando su función se modulaba a través de Alloswitch-1. Este experimento fue una prueba de principio de la hipótesis principal del proyecto.

El siguiente paso consistió en utilizar un enfoque similar para mantener la actividad de un circuito dañado para evaluar si se mejoraba la recuperación de lesiones. Para este objetivo se trabajó con renacuajos NBT-GFP. Esta línea transgénica expresa GFP en los procesos neuronales. Dado que los nervios muestran una fuerte fluorescencia, es posible cortarlos y seguir su reformación en animales vivos. Hemos observado que los renacuajos reforman en 4 días un nervio olfativo lesionado. Curiosamente, la reformación es generalmente correcta, pero se crean nervios aberrantes en ~10% de los casos. Considerando que la conectividad aberrante es responsable de la espasticidad, la pérdida del control de los reflejos, el dolor y otros efectos secundarios de lesiones cerebrales y medulares, contamos con un excelente modelo para investigar los factores que promueven el cableado correcto *versus* el cableado incorrecto de las conexiones nerviosas después de una lesión.

A continuación aplicamos un PTL específico en el bulbo olfatorio, denominado TSP. Este compuesto es activo sobre los receptores de AMPA, que se encargan de la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria en el cerebro. En el experimento iluminamos renacuajos con diferentes patrones de luz durante 4 días y se analizó si los nervios mejoraban su reformación. Los datos preliminares muestran que los nervios se vuelven a formar en dos fases secuenciales: reconexión y consolidación. Aparentemente, la primera fase de reconexión de las vías nerviosas se ve influenciada positivamente por una mayor actividad del bulbo olfativo. La complejidad de los experimentos ha impedido obtener datos concluyentes, pero los resultados preliminares son prometedores. Los esfuerzos actuales de los laboratorios se centran en completar estas investigaciones.

Queremos señalar que las líneas de investigación establecidas han sido también muy importantes para complementar las actividades de laboratorio en los grupos de investigación de los Dres. Llobet y Gorostiza. Por ejemplo, el trabajo con PTL ha

sido clave para la comprensión de los mecanismos moleculares de la endocitosis mediada por clatrina de las vesículas sinápticas, así como la colonia de renacuajos de *X. tropicalis* ha sido extremadamente útil para realizar estudios *in vivo* de eliminación de sinapsis. El trabajo iniciado con esta concesión de la Fundació La Marató de TV3 continúa, ya que los grupos de investigación mantienen una colaboración regular.

Finalmente, el resultado del proyecto puede resumirse por la publicación de dos artículos en revistas de alto impacto: Nature Chemical Biology y Angewandte Chemie (edición internacional) y un artículo metodológico en el Journal of Biological Methods. Algunos de los resultados obtenidos han sido presentados en reuniones internacionales, como la reunión europea de la Federación de Sociedades de Neurociencia (FENS) en las ediciones de 2012 y 2014.

### 3. Relevancia y posibles implicaciones

Estamos muy satisfechos con la posible aplicabilidad de los resultados obtenidos:

1) Se ha descrito que Alloswitch-1 es capaz de controlar la conducta motora de animales en función de la luz. Este hallazgo es una prueba de principio que muestra las posibilidades de la fotofarmacología: es posible controlar las redes neuronales con la aplicación de compuestos exógenos con una actividad de luz dependiente (Pittolo *et al.*, Nature Chemical Biology, 10 [10]: 813-815 [2014]).

2) Hemos utilizado renacuajos de *Xenopus tropicalis* para mostrar el papel de P4.2, un péptido de 20 residuos derivado de SPARC, que es una proteína secretada por glía, para eliminar las sinapsis. La eliminación de sinapsis juega un papel fundamental en el desarrollo, las lesiones traumáticas del cerebro y la neurodegeneración. Nuestros resultados abren la posibilidad a usar el péptido para realizar una eliminación selectiva, luz dependiente, de conexiones aberrantes establecidas después de lesiones cerebrales (López-Murcia *et al.*, PNAS, 2014). Al comienzo del proyecto describimos un método para modificar péptidos de la vía de clatrina mediante la luz (Névola *et al.*, Angewandte Chemie - International Edition, 52 [30] 7704-7708 [2013]). En experimentos futuros podríamos modificar el

péptido P4.2 para que sea sensible a la luz y así utilizarlo para eliminar selectivamente los contactos sinápticos no deseados.

3) Nuestros métodos muestran que podemos generar un marcapasos *in vivo* de neuronas mediante PTL. En la actualidad estamos usando TSP, un compuesto que interactúa con los receptores de AMPA. Todavía estamos ajustando las variables que afectan a la función del TSP, por ejemplo, patrones de luz, tiempo de incubación etc., sobre la reformación de las sinapsis en el bulbo olfativo tras una lesión. Los resultados obtenidos validan la viabilidad de este enfoque. La vía está abierta y ahora es el momento de hallar los mejores compuestos posibles y estudiar cómo sacar el mayor provecho de las aproximaciones optofarmacológicas.

#### 4. Bibliografía

López-Murcia FJ, Terni B, Llobet A.

*SPARC triggers a cell-autonomous program of synapse elimination.*

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). 2015. 112(43): 13366-13371.

DOI: 10.1073/pnas.1512202112.

Pittolo S, Gómez-Santacana X, Eckelt K, Rovira X, Dalton J, Goudet C, Pin JP, Llobet A, Giraldo J, Llebaria A, Gorostiza P.

*An allosteric modulator to control endogenous G protein-coupled receptors with light.*

Nature Chemical Biology. 2014. 10(10): 813-815.

DOI: 10.1038/nchembio.1612.

López-Murcia FJ, Royle SJ, Llobet A.

*Presynaptic clathrin levels are a limiting factor for synaptic transmission.*

The Journal of Neuroscience. 2014. 34(25): 8618-8629.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5081-13.2014.

Nevola L, Martín-Quirós A, Eckelt K, Camarero N, Tosi S, Llobet A, Giralto E, Gorostiza P.

*Light-regulated stapled peptides to inhibit protein-protein interactions involved in clathrin-mediated endocytosis.*

Angewandte Chemie - International Edition. 2013. 52(30): 7704-7708.

DOI: 10.1002/anie.201303324.

Kay Eckelt, Helena Masanas, Artur Llobet, Pau Gorostiza

*Automated high-throughput measurement of body movements and cardiac activity of Xenopus tropicalis tadpoles.*

J Biol Methods 2014 1(2):e9.

DOI: 10.14440/jbm.2014.29