



Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

¿Desempeña la señalización por Ret un papel importante en el síndrome de Smith-Lemli-Opitz?

Dr. Mario Encinas Martín

Institut de Recerca Biomèdica de Lleida Fundació Dr. Pifarré
Hospital Universitari Arnau de Vilanova



1. Resumen

El síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS; OMIM 270400, ORPHA818) es un síndrome autosómico recesivo con una incidencia de aproximadamente 1/50.000 nacimientos. Se presenta con un fenotipo muy heterogéneo, causando la muerte perinatal en sus formas más agudas. En general, los niños afectados por SLOS muestran retraso en crecimiento, retraso en el desarrollo y discapacidad intelectual. También pueden presentar defectos craneofaciales (microcefalia, micrognatia, y ptosis), polidactilia postaxial de las manos o los pies, y sindactilia de los dedos segundo y tercero. Otras malformaciones incluyen hipoplasia renal, ambigüedad genital en los hombres, estenosis pilórica, aganglionosis del colon (enfermedad de Hirschsprung), holoprosencefalia y malformaciones cardíacas. Los pacientes afectados son hiperactivos, muestran conductas autolesivas y rasgos autistas.

El síndrome está causado por mutaciones del gen de la 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR7), que cataliza el último paso de la biosíntesis de colesterol, la conversión de 7-dehidrocolesterol (7-DHC) a colesterol. La deficiencia en DHCR7 típicamente resulta en niveles elevados de 7-DHC y bajos de colesterol. Los mecanismos moleculares causantes del síndrome son desconocidos. El colesterol es un componente esencial de la membrana plasmática, siendo además precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares, entre otras. Además, el colesterol es un componente crítico de los microdominios de membrana plasmática conocidos como balsas lipídicas (*lipid rafts*). Algunas características del síndrome pueden ser explicadas por defectos en la señalización por *sonic hedgehog* (Shh). Shh es un morfógeno involucrado en el desarrollo de las extremidades, estructuras craneofaciales, cerebro y médula espinal. Las mutaciones de SHH en humanos causan holoprosencefalia, una malformación del cerebro también hallada en pacientes afectados por SLOS. Por otro lado, la sustitución del colesterol por 7-DHC altera tanto la estabilidad de las *lipid rafts* como su composición proteica en algunos tipos celulares. En cualquier caso, dada la

multiplicidad de funciones de colesterol, es poco probable que un solo mecanismo patológico cause las diferentes malformaciones y problemas clínicos que presentan estos pacientes.

Los ligandos de la familia GDNF (GFL) constituyen un grupo de factores neurotróficos (GDNF, NRTN, PSPN, ARTN) que regulan varios aspectos del desarrollo del sistema nervioso. Más allá del sistema nervioso, estos factores desempeñan un papel crucial en la morfogénesis del riñón y la maduración de las espermátidas. Los GFL señalizan a través de un receptor tirosina cinasa común (Ret), y uno de los cuatro correceptores conocidos como GFR α , que se unen directamente a los GFL y proporcionan especificidad de ligando. Los GFR α están unidos a la cara externa de la membrana plasmática a través de un anclaje de glicosil fosfatidil inositol, que los localiza en las *lipid rafts*. Estudios *in vitro* muestran que la estimulación por GFL recluta a Ret en *lipid rafts*, donde el complejo ternario GFL-GFR α -Ret interactúa con la familia de cinasas Src para provocar respuestas biológicas óptimas. Por último, el reclutamiento de Ret en las *lipid rafts* evita su degradación proteasomal.

In vivo, la señalización de Ret es necesaria para el correcto desarrollo del sistema nervioso autónomo y el sistema genitourinario. El sistema nervioso entérico (ENS) se forma cuando las células vagales de la cresta neural migran en dirección rostro-caudal para colonizar el intestino en respuesta a la señalización por Ret. Los ratones Ret^{-/-} carecen de neuronas entéricas distales en el estómago, mientras que algunas mutaciones puntuales Ret causan diferentes grados de aganglionosis colónica, similares a la enfermedad de Hirschsprung en humanos. Por otro lado, los precursores de las neuronas simpáticas migran a su posición final y extienden axones guiados por un gradiente de ARTN expresado por los vasos sanguíneos. Los ratones que carecen o bien de ARTN o de su correceptor GFR α 3 desarrollan ptosis debidas a defectos en migración y extensión axonal de estos precursores. Por último, la señalización de Ret es crucial para el desarrollo del riñón, que comienza cuando una

evaginación del conducto de Wolff, la yema ureteral (UB), invade el mesénquima y se ramifica repetidamente en respuesta a GDNF hasta formar el sistema colector del riñón. Los ratones *knock-out* para GDNF, GFR α 1 o Ret nacen sin riñones debido a la falta de evaginación de la UB.

En el presente proyecto nos propusimos determinar si las anomalías congénitas que se encuentran tanto en SLOS como en ratones mutantes para Ret (ptosis, malformaciones renales y la enfermedad de Hirschsprung) se deben una señalización aberrante o insuficiente por Ret, debido a la incapacidad del 7-DHC de formar correctamente *lipid rafts*. Nuestros datos muestran que la señalización de Ret es en gran medida normal en un modelo murino de SLOS. Cabe señalar que el tratamiento *in utero* con simvastatina resulta perjudicial para el desarrollo adecuado de estos ratones.

2. Resultados

Los sistemas nervioso entérico y urinario son normales en ratones DHCR7^{-/-} neonatos

Un examen macroscópico del sistema genitourinario de ratones mutantes recién nacidos no reveló malformaciones tales como aplasia o hipoplasia renal, riñones císticos o supernumerarios, o anomalías del uréter, todas ellas consistentes con una señalización aberrante por Ret. Los riñones mutantes presentaron una arquitectura normal, con la corteza y médula bien organizadas, sin signos de hidronefrosis. El número de glomérulos fue comparable entre ratones *knock-out* DHCR7 y sus hermanos *wild type*, indicando una ramificación adecuada de la UB. No se detectaron signos de aganglionosis colónica en tinciones contra PGP9.5. Por último, se evaluó la densidad del plexo entérico mediante actividad acetilcolinesterasa, revelando de nuevo ausencia de diferencias entre genotipos.

La eliminación de un alelo de Ret no causa alteraciones renales o entéricas en ratones DHCR7^{-/-}

Con el fin de determinar si la reducción de la dosis génica de Ret puede causar defectos en el desarrollo del ENS o del sistema urinario en el contexto de deficiencia en DHCR7, cruzamos ratones mutantes DHCR7 con ratones *knock-in* que expresan una copia de EGFP desde el locus de Ret. Los ratones resultantes son haploinsuficientes para Ret y expresan la EGFP en células que normalmente expresan Ret, lo que permite su fácil seguimiento. El análisis de estos animales tanto durante el desarrollo embrionario como en el momento de nacer indicó que la pérdida de una copia de Ret no afecta a la ramificación de la yema ureteral ni, por tanto, al número final de glomérulos, así como tampoco lo hace a la densidad del plexo entérico.

El tratamiento con simvastatina afecta al desarrollo renal y del ENS

Los resultados anteriores no resultan sorprendentes a la luz del fenotipo relativamente leve de los ratones DHCR7^{-/-} en comparación con los pacientes afectados por SLOS. Generalmente se asume que estas discrepancias se deben a diferencias en el transporte transplacentario de colesterol, que en roedores es cuantitativamente mucho mayor que en humanos. En un intento de reducir la tasa de transferencia de colesterol materno-filial, tratamos ratonas gestantes con simvastatina, un inhibidor de la enzima limitante de la síntesis de colesterol, y analizamos los riñones y el ENS en ratones neonatos. Un examen detallado de los riñones mutantes reveló que el número de glomérulos se redujo en los ratones *knock-out*. Por otra parte, el tratamiento con simvastatina también causó una reducción en la densidad del plexo entérico del colon en las crías mutantes respecto a sus hermanos controles. Por lo tanto, el tratamiento con simvastatina causó anomalías renales y del sistema nervioso entérico consistentes con una reducción de señalización Ret.

La UB de los ratones DHCR7^{-/-} se ramifica a más lenta velocidad que la de los ratones DHCR7^{+/+} *in vitro*

Al margen del tratamiento con simvastatina, decidimos examinar la tasa de ramificación de la UB *in vitro*, en un intento de estudiar la señalización por Ret evitando el efecto de la transferencia de colesterol materno. Para ello se cultivaron metanefros de ratones de edad embrionaria E12.5 en medio definido, carente de cualquier fuente exógena de colesterol, y se contaron extremos de la yema ureteral después de dos y cinco días *in vitro*. Después de dos días en cultivo se encontraron pequeñas diferencias, aunque significativas, entre riñones *wild type* y DHCR7^{-/-}, que se incrementaron al cabo de cinco días, sugiriendo que cuando los riñones de estos animales se cultivan en ausencia de colesterol exógeno, aparecen diferencias consistentes con una señalización por Ret atenuada.

La señalización de Ret no se ve afectada por la eliminación de DHCR7 en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior

A pesar de que la señalización por el eje GDNF-GFR α 1-Ret es el actor principal en la ramificación de la UB, las observaciones anteriores no prueban directamente una señalización subóptima de Ret en este sistema. Para evaluar directamente las respuestas biológicas a GDNF elegimos las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior como sistema modelo, dada la facilidad de su cultivo y su sensibilidad a GDNF. No se encontraron diferencias importantes en la fosforilación de ERK mediada por GDNF entre neuronas *wild type* y mutantes. Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia de las neuronas simpáticas en presencia de concentraciones crecientes de GDNF. Finalmente, el crecimiento neurítico en explantes de SCG en respuesta a GDNF también fue similar entre genotipos. Por lo tanto, al menos para las neuronas simpáticas, la mutación de DHCR7 no parece tener consecuencia alguna en la señalización de Ret.

La composición proteica de las *lipid rafts* es similar en ratones DHCR7^{+/+} y DHCR7^{-/-}

A continuación quisimos investigar si la falta de efecto de la mutación DHCR7 en la actividad Ret en neuronas del SCG se debía a la ausencia de diferencias en la composición proteica de las *lipid rafts*. Con este fin generamos gradientes de flotación de extractos de cerebro neonatal, tanto controles como DHCR7 de ratones. Es importante destacar que el colesterol no cruza la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, la contribución de colesterol materna al cerebro es insignificante. La localización de GFR α 1 y c-Src, dos componentes críticos de la señalización por Ret que residen en las *lipid rafts* era similar entre cerebros de ratones *wild type* y *knock-out* para DHCR7. Como control de estos experimentos se comprobó que algunos marcadores de *rafts* (gangliósido GM1, caveolina-1 y flotilina-1) y *no rafts* (receptor de transferrina) se hallaban en las fracciones adecuadas. Por lo tanto, la pérdida de DHCR7 no afecta a la distribución en las *lipid rafts* de componentes críticos de la señalización por Ret.

El 7-DHC mantiene una correcta señalización por Ret

Para testar directamente la hipótesis de que el 7-DHC puede sustituir de forma eficiente al colesterol en cuanto a la señalización por Ret se refiere, se llevaron a cabo experimentos de extracción de colesterol y sustitución por 7-DHC, utilizando metil- β -ciclodextrina (M β CD). En primer lugar confirmamos que la depleción del colesterol de la membrana mediante M β CD afectaba a la señalización mediada por Ret en neuronas simpáticas. La fosforilación de ERK1/2 y Akt mediada por GDNF se vio afectada en diferentes grados por M β CD, siendo la vía de PI3-K/Akt más sensible a la depleción de colesterol. Dado que el M β CD resultó tóxico a concentraciones elevadas incluso durante tiempos cortos de exposición, nos centramos en la fosforilación de Akt en los experimentos de reposición con 7-DHC. Los resultados de estos experimentos demostraron que el 7-DHC es capaz de soportar una señalización eficiente por GDNF.

En conclusión, aunque bajo ciertas condiciones (tratamiento con simvastatina o cultivos *in vitro*) se observan ligeras deficiencias consistentes con una disminución de la señalización por Ret, el análisis directo de la misma no permite concluir que la ausencia de colesterol/presencia de 7-DHC impida una señalización óptima por Ret.

3. Relevancia e implicaciones terapéuticas

Este es esencialmente un proyecto de ciencia básica cuyo objetivo es profundizar en los mecanismos moleculares causantes del fenotipo de pacientes con SLOS. La justificación de la propuesta se basa en dos observaciones: en primer lugar, las *lipid rafts* han demostrado ser importantes para la señalización por Ret *in vitro* y, en segundo lugar, los pacientes SLOS muestran defectos de desarrollo coherentes con una alteración de la señalización de Ret. Creemos que es de gran relevancia para el campo de la transducción de señales, porque si bien la composición y el funcionamiento de las *lipid rafts* se ha analizado con gran detalle *in vitro*, la controversia respecto a estos microdominios de membrana que existen bajo condiciones fisiológicas permanece. La disfunción de la señalización por Ret en ratones deficientes para DHCR7 sugeriría que las *lipid rafts* son importantes para la transducción de señales *in vivo*.

En cuanto a las implicaciones translacionales del presente proyecto, una posible terapia dirigida a prevenir defectos del desarrollo podría ser el tratamiento con agonistas Ret *in utero*, como por ejemplo XIB4035, que ha demostrado eficacia en el tratamiento de determinadas neuropatías modelos murinos y, a diferencia GFL, posee el potencial de atravesar la barrera hematoencefálica. Desgraciadamente, la falta de evidencia de un papel de la señalización por Ret en la patogénesis de SLOS no justificaría dicha intervención.

Por último, una observación importante derivada de nuestros estudios es que la administración de simvastatina *in utero* es perjudicial en lugar de ser beneficiosa para el desarrollo del embrión mutante. Estos resultados, salvando las distancias entre ratón y humano, han de ser tenidos en cuenta, ya que el tratamiento con simvastatina se ha propuesto como una intervención terapéutica para los niños afectados con SLOS.

4. Publicaciones

Actualmente estamos preparando un manuscrito con la descripción de estos hallazgos.