

Título: PAPEL DE LA ANOSMINA-1 EN LA NEUROGÉNESIS DEL SISTEMA OLFATIVO DURANTE EL DESARROLLO Y EN UN MODELO DE SOBREENPRESIÓN EN RATÓN TRANSGÉNICO.

Nombre: García González, Diego

Universidad: Universidad Autónoma de Madrid

Departamento: Anatomía, histología y neurociencia

Fecha de lectura: 20/12/2012

Programa de doctorado: RD 778/1998

Dirección:

> **Director:** FERNANDO DE CASTRO SOUBRIET

> **Tutor/Ponente:** FRANCISCO CLASCÁ CABRE

Tribunal:

> **presidente:** CARLOS AVENDAÑO TRUEBA

> **secretario:** MARIA ISABEL FARIÑAS GOMEZ

> **vocal:** CARLOS CRESPO RUPEREZ

> **vocal:** Oscar Marín Parra

> **vocal:** ANGEL ACEBES VINDEL

Descriptor:

> BIOQUIMICA MOLECULAR

> NEUROCIENCIAS

> GENETICA DEL DESARROLLO

> DESARROLLO ANIMAL

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Resumen: 1. - ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

El sistema olfativo representa un interesante objeto de estudio por los múltiples procesos biológicos que engloba y cuyo análisis supone un continuo aporte de valiosa información sobre el funcionamiento del sistema nervioso desde el siglo XX. Su interés proviene no sólo de sus características propias como sistema sensorial, sino también del descubrimiento de su creciente interrelación con otras estructuras y sistemas, lo que lo convierte de esta forma y gracias a procesos biológicos tan variados como la percepción sensorial, la transducción de señales, el crecimiento axonal, la neurogénesis, la migración celular o su relación con el sistema neuroendocrino, por mencionar sólo algunas, en un atractivo modelo de estudio por las implicaciones funcionales que presenta.

A modo de breve resumen, el sistema olfativo está compuesto de neuronas sensitivas olfativas (NSO)

localizadas en el epitelio olfativo, capaces de detectar odorantes que entran en contacto con la mucosa y que envían impulsos eléctricos al sistema nervioso central (SNC), donde esta información es procesada de diversas formas en función de cada especie. En vertebrados, el primer relevo sináptico tiene lugar en el bulbo olfativo (BO), donde llegan haces de axones provenientes del epitelio y, en los glomérulos del BO, forman sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas de proyección (mitrales y empenachadas) que, a su vez, emiten sus axones formando el tracto olfativo lateral (TOL) hasta la corteza olfativa, donde conectan con neuronas de las diversas estructuras corticales que procesarán la información. En paralelo, las feromonas son detectadas por neuronas localizadas en el órgano vomeronasal que proyectan al bulbo olfativo accesorio y éste, a su vez, proyecta a través del tracto olfativo medial y del TOL para conectar con la corteza piriforme y distintas regiones de la amígdala.

Tradicionalmente, la falta de olfato (anosmia) ha sido atribuida a una aplasia o hipoplasia del BO y/o a defectos en la formación del nervio olfativo (de Morsier, 1954; Truwit et al., 1993). Una de las causas más conocidas de la anosmia se debe al Síndrome de Kallmann (SK), que fue descrito originalmente por Maestre de San Juan, en el siglo XIX, como la asociación de la ausencia de estructuras olfativas en el cerebro y la presencia de testículos pequeños (Maestre de San Juan, 1856). Casi un siglo después, el grupo de Kallmann publicó un estudio en el que se caracterizó la presencia de hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) junto con anosmia (Kallmann et al., 1944). SK es la forma más común de disfunción sexual por defecto de gonadotropinas que, aproximadamente, se encuentra con una frecuencia de 1/10.000 en hombres y 1/50.000 en mujeres (Dodé and Hardelin, 2009).

Entre otros genes, se han descrito mutaciones en el gen KAL-1, que codifica la proteína anosmina-1, en la variante con herencia asociada al sexo en el cromosoma X, conduciendo siempre a anosmia y se han visto asociadas a ausencia o hipoplasias de lo BO y sus tractos (Legouis et al., 1991; Franco et al., 1991), mientras que pacientes con mutaciones en los genes KAL-2 (Dodé et al., 2003), que codifica el receptor de factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGFR1), o FGF-8 (Falardeau et al., 2008), que da lugar al factor de crecimiento fibroblástico 8, ambos defectivos en la variante autosómica, sólo conducen a anosmia en la mitad de los casos (Martin et al., 2011). Así mismo, se han descrito mutaciones de pérdidas de función en otros genes que producen SK con variante autosómica, como por ejemplo: prokineticina 2 (PROK2) y su receptor (PROKR2) (Dodé et al., 2006; Sarfati et al., 2010), CHD7 (Kim et al., 2008), WDR11 (Kim et al., 2010) y Sema3A (Young et al., 2011; Hanchate et al., 2012). Sin embargo, mutaciones en todos estos genes se han encontrado en un 30% de los pacientes de SK (Dodé and Hardelin, 2009; Mitchell et al., 2011), lo cual sugiere que faltan por ser identificados otros genes todavía.

El gen KAL-1 se encuentra localizado en la región Xp22.3 y codifica para anosmina-1, una proteína de matriz extracelular secretable (Legouis et al., 1991; Franco et al 1991) de 680 aminoácidos (SwissProt P23352) con un peso molecular de 85-100 KDa (Rugarli et al, 1996; Hardelin et al 1999). La estructura multidominio de la proteína está compuesta de un péptido señal N-terminal, seguido de una región rica en cisteínas, un dominio WAP, un dominio con cuatro repeticiones en tándem de tipo fibronectina III y por último, una región C-terminal rica en histidinas (Franco et al., 1991; Rugarli et al. 1996; Hardelin et al 1999).

Aunque el mecanismo de acción todavía no se conoce en su totalidad, se ha visto que anosmina-1, al igual que FGF-2, interacciona con el receptor de membrana FGFR1, así como con distintos componentes de la membrana extracelular (laminina, fibronectina, anosmina-1). Es importante destacar que anosmina-1 presenta

cinco motivos de unión a heparán-sulfatos, cuya interacción parece necesaria para el correcto funcionamiento de la proteína (Rugarli et al, 1996; Guimond and Turnbull, 1999; Roberston et al 2001; Dodé et al 2003; Hu et al 2004; Bülow and Hobert 2004; González-Martínez et al. 2004; Cariboni et al., 2004). De todos estos mecanismos de acción, el más estudiado es su interacción con FGFR1 (Dodé et al 2003; González-Martínez et al 2004; Bribián et al 2006; Hu et al 2009).

Una de las consecuencias de las mutaciones en KAL-1 es que se produce un fallo en la migración de las neuronas GnRH-1 (liberadoras de hormonas gonadotropinas) en su ruta desde la placoda olfativa al hipotálamo durante el desarrollo, dando lugar al hipogonadismo hipogonadotrópico propio del SK (Wray et al., 1989; Dellovade et al., 2003). Esta reducida población neuronal (alrededor de unas 800 en ratón) se encuentra dispersa desde el área preóptica hasta el hipotálamo, donde sincronizan y coordinan la síntesis del péptido GnRH-1 de modo pulsátil en el sistema porta hipofisario y, en consecuencia, la liberación de la cascada de hormonas sexuales (Wray et al., 1989; Whitlock, 2005). Algunos pacientes del SK presentan un fallo en el desarrollo de los BOs, impidiendo que los axones del nervio olfativo entren en el telencéfalo y por tanto, bloqueando la migración de las neuronas GnRH-1 (Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Wray et al., 1989; Dellovade et al., 2003). En relación con esto, se ha descrito que anosmina-1 induce, vía FGFR1, el crecimiento de neuritas y remodelación del citoesqueleto en neuroblastos GnRH (González-Martínez et al., 2004) y que tiene un efecto quimioatrayente sobre neuroblastos GnRH-1 inmortalizados de origen humano (Cariboni et al., 2004). Dichos efectos directos de anosmina-1 permiten pensar que su ausencia provocaría el fallo en la migración de neuronas secretoras de GnRH-1. Se ha visto que anosmina-1 desempeña funciones importantes en otros procesos relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central (SNC): sirve de guía en el crecimiento axonal y en la formación de colaterales de células mitrales y de Purkinje (Soussi-Yanicostas et al., 2002, Gianola et al., 2009) y participa en la migración de los precursores de oligodendrocitos durante el desarrollo, en el SNC adulto y en condiciones patológicas (Bribián et al., 2006; Bribián et al., 2008; Clemente et al., 2011), en este último caso modulando el efecto motogénico de FGF-2 vía FGFR1 (Bribián et al., 2006; Clemente et al., 2011).

La zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales es una región con una gran capacidad neurogénica durante el desarrollo del cerebro de roedores, así como en el adulto (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Dichos precursores migran tangencialmente en cadenas desde su lugar de origen a lo largo de la corriente migratoria rostral (CMR) hasta los BOs, donde pasan a migrar radialmente mientras que se diferencian hasta alcanzar las capas granular y periglomerular del bulbo, estableciendo en su destino conexiones sinápticas funcionales (Lledó et al., 2008). En el SNC, la migración de neuroblastos desde la ZSV es el resultado de un complejo equilibrio de fuerzas repelentes y atrayentes, provocadas por la combinación espacio-temporal de moléculas señalizadoras que generan así diversos grados de sustratos permisivos, como por ejemplo: PSA-NCAM (Cremer et al., 1994), Slits (Wu et al., 1999), netrina-1 (Murase y Horwitz, 2002), ErbB4 (Anton et al., 2004), prokineticina-2 (Ng et al., 2005), GDNF (Paratcha et al., 2006) y proteínas de matriz extracelular, como la reelina o la tenascina-R (Hack et al., 2002; Saghatelian et al., 2004). Sin embargo, poco se sabe en detalle acerca de las señales y mecanismos que desencadenan la migración de neuroblastos desde la ZSV cuando la CMR es aún inmadura (antes de P20) y los canales astrocitarios no se encuentran desarrollados todavía.

2. ¿ BIBLIOGRAFIA MAS RELEVANTE

- Álvarez-Buylla y García-Verdugo. 2002. *J Neurosci* 22:629-634.
- Anton et al., 2004. *Nat Neurosci* 7:1319-1328.
- Bribián A. 2008. *Dev Neurobiol* 68:1503-1516.
- Bribián A. 2006. *Mol Cell Neurosci* 33:2-14.
- Bülow HE y Hobert O. 2004. *Neuron* 41:723-736.
- Cariboni A et al., 2004. *Hum Mol Genet* 13:2781-2791.
- Cremer H et al., 1994. *Nature* 367:455-459.
- Dellovade TL et al., 2003. *Brain Res Dev Brain Res* 140:157-167.
- Dodé C et al., 2003. *Nat Genet* 33:463-465.
- Dodé C et al., 2006. *PLoS Genet* 2:e175.
- Dodé C y Hardelin JP. 2009. *Eur J Hum Genet* 17:139-146.
- Falardeau J et al., 2008. *J Clin Invest* 118:2822-2831.
- Franco B et al., 1991. *Nature* 353:529-536.
- Gianola S et al., 2009. *Neuroscience* 158:570-584.
- González-Martínez D et al., 2004. *J Neurosci* 24:10384-10392.
- Guimond SE y Turnbull JE. 1999. *Curr Biol* 9:1343-1346.
- Hack I et al., 2002. *Nat Neurosci* 5:939-945.
- Hanchate NK et al., 2012. *PLoS Genet* 8:e1002896.
- Hardelin JP et al., 1999. *Dev Dyn* 215:26-44.
- Hu Y et al., 2004. *J Biochem* 384:495-505.
- Hu Y et al., 2009. *J Biol Chem* 284:29905-29920.
- Kallmann F et al., 1944. *Am J Mental Defic* 48:203-236.
- Kim SH et al., 2008. *J Neuroendocrinol* 20:141-163.
- Kim HG y Layman LC. 2011. *Mol Cell Endocrinol* 346:74-83.
- Legouis R et al., 1991. *Cell* 67:423-435.
- Lledó, PM et al., 2008. *Trends Neurosci* 31, 392-400.
- Maestre de San Juan A. 1856. *Siglo Médico* 131:211.
- Martin C et al., 2011. *Endocr Rev* 32:225-246
- Mitchell AL et al., 2011. *Trends Endocrinol Metab* 22:249-258.
- de Morsier G. 1955. *Arch.Neurol Psychiat* 74:309-361.
- Murase S y Horwitz AF. 2002. *J. Neurosci.* 22:3568-3579.
- Ng KL et al., 2005. *Science* 308:1923-1927.
- Paratcha G et al., 2006. *Mol Cell Neurosci* 31, 505-514.
- Robertson A et al., 2001. *J Biochem* 357:647-659.
- Rugarli EI et al., 1996. *Hum Mol Genet* 5:1109-1115.
- Saghatelian A et al., 2004. *Nat Neurosci* 7:347-56.
- Sarfati J et al., 2010. *Front Horm Res* 39:121-132.
- Schwanzel-Fukuda M. et al., 1989. *Brain Res Mol Brain Res* 6:311-326.
- Soussi-Yanicostas N et al., 2002. *Cell* 109:217-228.
- Truwit CL et al., 1993. *Am J Neuroradiol* 14:827-838.
- Whitlock KE. 2005. *Trends Endocrinol Metab* 16:145-151.
- Wray S et al., 1989. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8132-8136.
- Wu W et al., 1999. *Nature* 400, 331-336.

Young J et al., 2012. Hum Reprod 27:1460-1465.

3. ¿ HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Anosmina-1 es una glicoproteína de matriz extracelular cuyos efectos han sido descritos en numerosos procesos del desarrollo del SNC y, en especial, en el sistema olfativo. Diversos estudios han demostrado que esta proteína interacciona con FGFR1 y activa su señalización. Además, es capaz de modular la acción de FGF2 cuando este se une también a FGFR1. FGF2 es un factor de crecimiento conocido, sobre todo, por sus efectos pleiotrópicos como agente angio, moto y mitogénico. En concreto, se ha descrito su papel como potente mitogénico sobre las células progenitoras neurales de los nichos neurogénicos, como la zona subventricular (SVZ) del cerebro anterior durante el desarrollo y en el adulto.

Por otro lado, cuando se encuentran mutados los genes que codifican para anosmina-1 o FGFR1, aparece en humanos el síndrome de Kallmann, en el que se asocian anosmia e hipogonadismo hipogonadotrópico. En estos pacientes con este síndrome, una de las causas descritas para la anosmia es el desarrollo defectuoso del bulbo olfativo. Otras mutaciones asociadas al síndrome de Kallmann como, por ejemplo, en el gen que codifica para prokinetina-2, dan lugar a un severo fallo en la migración de los precursores de interneuronas que migran desde su nicho neurogénico, la SVZ, hasta su lugar de destino final: el bulbo olfativo.

Por todo ello, nos hemos planteado como hipótesis de este trabajo que anosmina-1 y, por extensión, el sistema que forma con FGF2 y FGFR1, desempeñe una función relevante en la neurogénesis del sistema olfativo, más concretamente en la migración de precursores neuronales desde la SVZ al bulbo olfativo, tanto durante el desarrollo como en el adulto.

El objetivo global de este trabajo es, por tanto, el análisis del papel de anosmina-1 en la neurogénesis del sistema olfativo durante el desarrollo y en el SNC adulto, y puede desglosarse en los siguientes objetivos concretos:

- 1- Estudio del patrón de expresión de anosmina-1 y FGF2 en la SVZ y en las poblaciones celulares que componen este nicho neurogénico durante el desarrollo embrionario y postnatal.
- 2- Determinar el efecto de anosmina y FGF-2 en la neurogénesis de la SVZ y en la subsiguiente migración de los precursores de interneuronas desde la SVZ al bulbo olfativo durante el desarrollo embrionario y postnatal.
- 3- Estudio del efecto de la sobreexpresión de anosmina-1 en el sistema olfativo del individuo adulto en una cepa de ratón transgénico que sobreexpresa dicha proteína.

4. ¿ RESULTADOS FINALES Y CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos propuestos, los resultados obtenidos con el presente trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Las proteínas anosmina-1, FGF2 y FGFR1 se expresan de forma dinámica en el área neurogénica comprendida desde la SVZ al bulbo olfativo a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal.

2. Anosmina-1 y FGF2 intervienen en la migración de los neuroblastos de la SVZ, sobre los que ejercen un papel quimioatrayente y motogénico, respectivamente. Estos efectos se producen antes de que la RMS adquiera su aspecto maduro y se cuentan, por tanto, entre las moléculas que antes actúan en esta importante ruta de migración neuronal.
3. Los efectos de anosmina-1 y FGF2 sobre la migración de los neuroblastos se producen, principalmente, a través de FGFR1, aunque no podemos descartar que otros receptores participen de forma adicional en el proceso.
4. Anosmina-1 no tiene un efecto significativo en la proliferación de los diferentes tipos celulares de la SVZ, mientras que FGF2 estimula potentemente la división de células de estirpe astroglial en exclusiva.
5. La sobreexpresión de anosmina-1 en una cepa de ratón transgénico produce, en el adulto, alteraciones morfológicas de aquellas células de la SVZ que mayor cantidad de FGFR1 expresan: las células endimarias y las células progenitoras neurales.
 - a. El análisis ultraestructural al microscopio electrónico revela alteraciones en la morfología y organización de los cilios de las células endimarias de la SVZ.
 - b. Dicha sobreexpresión de anosmina-1 induce de modo global la proliferación en la SVZ, expandiendo significativamente la población de células precursoras neurales que dan lugar, en última instancia, a los precursores de interneuronas que migran al bulbo olfativo a lo largo de la RMS.
6. El cuerpo basal del cilio primario de las células progenitoras neurales de la SVZ expresa FGFR1, lo que bien pudiera explicar el funcionamiento de esta estructura como antena mecánica y quimiorreceptora.
7. La sobreexpresión de anosmina-1 modifica las propiedades adherentes de los neuroblastos de la SVZ y promueve su motilidad intrínseca.
8. La conjunción del incremento de proliferación en la SVZ y de la mayor capacidad migratoria de los neuroblastos, ambos derivados de la sobreexpresión de anosmina-1 en el SNC adulto, conducen a un aumento del número de interneuronas inhibitorias que llegan al bulbo olfativo desde la SVZ.
9. La sobreexpresión de anosmina-1 produce un desequilibrio en la densidad final de las distintas poblaciones de interneuronas GABAérgicas en el bulbo olfativo adulto, que son: granulares maduras NeuN+, PV+ de la capa plexiforme externa y periglomerulares dopaminérgicas TH+.
10. La sobreexpresión de anosmina-1 genera alteraciones en el comportamiento olfativo de los ratones transgénicos, afectándose tanto la percepción/procesamiento de la información en el bulbo olfativo como la memoria olfativa a corto plazo.

