

Proyecto: EVALUACIÓN DE LAS SECRETED FRIZZLED RELATED PROTEINS (SFRPS) COMO POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS EN LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE RETINA.

Investigador Principal: Paola Bovolenta, CBMSO, CSIC-UAM

Informe final de los resultados obtenidos

En este proyecto nos **propusimos determinar si las diferentes proteínas Sfrps están directamente implicadas en la degeneración de los fotorreceptores en modelo de ratón y examinar sus efectos sobre la viabilidad de los fotorreceptores.**

Estos objetivos están basados en observaciones previas de nuestro laboratorio que demuestran que los niveles de expresión de *Sfrp1*, una proteína secretada, están aumentados en diferentes modelos de ratón de Retinitis Pigmentosa, datos de la literatura que indican cambios similares en modelos diferente de los que hemos empleado y dos estudios que indican variaciones de la expresión de *Sfrp1*, *Sfrp2* y *Sfrp5* en retinas de Pacientes que padecían de Retinitis Pigmentosa.

En la retina de ratón se expresan tres proteínas Sfrps: *Sfrp1*, *Sfrp2* y *Sfrp5*. Para determinar su posible implicación en la viabilidad de los fotorreceptores decidimos utilizar ratones adultos en los cuales se ha inactivado la actividad de estos genes (ratones *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp5*^{-/-}), centrándonos inicialmente en *Sfrp1*. El análisis histológico de la retina de ratones silvestres (WT) y ratones *Sfrp1*^{-/-} reveló que en ausencia de *Sfrp1* ambos tipos de fotorreceptores (bastones y conos) presentaban alteraciones en su segmentos externos, puestas de manifiesto por la tinción con marcadores específicos. Estas alteraciones se acompañaban de ligeros defectos en la respuestas de los fotorreceptores a estímulo lumínico medida mediante electro-retino-gramas (ERG).

Para determinar con mas precisión estos defectos, en colaboración con la Dra. Concepción Lillo (Univ. de Salamanca) hemos analizado por microscopia electrónica las retinas de estos ratones. Este análisis confirma una desorganización de los fotorreceptores, que además se hace mas evidente con la edad. En particular se pierde la integridad de la membrana

limitante externa (OLM) que es constituida por el conjunto de las uniones adherentes entre la parte inicial del segmento externo de los fotorreceptores y células de Müller. Estas uniones están parcheadas o ausentes y asociadas a alteraciones en la distribución de la proteína β -catenina que normalmente se localiza en las uniones adherentes, así como hemos determinado por inmunocitoquímica. Estas alteraciones se asocian a un desplazamiento de los núcleos de los fotorreceptores, particularmente evidente para los núcleos de los conos. Además se encuentran frecuentes cambios en la estructura de los segmentos externos, hay presencia de núcleos picnóticos en la capa de los fotorreceptores y alteraciones en los contactos sinápticos entre fotorreceptores y células bipolares. Todos estas alteraciones demuestran que en ausencia de *Sfrp1* los fotorreceptores son más susceptibles a muerte celular y que este defecto es más frecuente con la edad. En sus conjuntos estos resultados indican que ***Sfrp1* es necesario para mantener la viabilidad y funcionalidad de los fotorreceptores en su estado óptimo.**

Un análisis morfológico y funcional similar en ratones deficientes en *Sfrp2* y *Sfrp5* sugiere que la ausencia de estos factores no conlleva alteraciones en la retina, tal vez porque su función puede ser remplazada por la de *Sfrp1*. La posible redundancia de estos factores podría explicar la ausencia de efectos evidentes. Por lo tanto decidimos analizar esta posibilidad generando ratones que carecen de combinaciones de estas proteínas. Desafortunadamente ratones deficientes en las tres proteínas o de la combinación *Sfrp1* y *Sfrp2* son letales a estadios embrionarios y por lo tanto no podemos de momento analizar su efecto en retina.

Para ahondar en el posible papel de *Sfrp1* como factor que contribuye a mantener el buen estado de los fotorreceptores postulamos que si *Sfrp1* efectivamente tiene un efecto protector, la retina de ratones *Sfrp1*^{-/-} debería ser más sensible a stress lumínico (fotolesión). Asimismo, la ausencia de *Sfrp1*^{-/-} debería acelerar la degeneración de los fotorreceptores, en un modelo genético de distrofia retiniana. Para abordar la primera hipótesis decidimos exponer grupos de ratones WT y *Sfrp1*^{-/-} a estímulos lumínicos nocivos mientras que en el segundo caso cruzamos ratones deficientes en *Sfrp1* con ratones *rd10*, un modelo de ratón frecuentemente usado para modelar la Retinitis Pigmentosa humana. La ausencia de *Sfrp1* conlleva una gran pérdida de fotorreceptores tras un estímulo lumínico, al contrario de los

que se observa en ratones WT. Así mismo, en ratones rd10; Sfrp1^{-/-} el curso temporal de la muerte celular que normalmente se observa en ratones rd10 es acelerada.

En su conjunto estos resultados indican que Sfrp1 podría ser un factor de susceptibilidad para la degeneración de los fotorreceptores. Por lo tanto, variaciones interindividuales en los niveles de expresión de Sfrp1 podrían conferir susceptibilidad o resistencia a la enfermedad y influir en la progresión de la muerte celular en individuos con mutaciones genéticas definidas.

Para ahondar en el posible mecanismo por el cual Sfrp1 contribuye a la supervivencia de los fotorreceptores decidimos hacer estudios bioquímicos. Recientemente hemos demostrado que Sfrp1 desempeña un papel en la regulación de ADAM10, una metalloproteasa con múltiple substratos, incluidos L1-NCAM, CD44, N-Cadherin y otros. Sobre esta base, hemos analizado el procesamiento de distintos posibles substratos de ADAM10 en 4 tipos de animales: 1) ratones silvestres; 2) ratones rd10; 3) ratones Sfrp1^{-/-} y 4) ratones rd10;Sfrp1^{-/-}. Nuestros resultados demuestran que en ratones rd10 y Sfrp1^{-/-} el procesamiento de distintas proteínas implicada en la adhesión de los fotorreceptores a la glía de Muller (N-cadherina y PCDH21, proto-cadherina-21) es superior a los ratones WT. Sin embargo, este procesamiento es todavía mas notable en las retinas de ratones rd10;Sfrp1^{-/-}. Este resultado es muy importante ya que estudios previos han demostrado por ejemplo que un aumento del procesamiento de PCDH21 causa foto-degeneración. Es por lo tanto posible que en ausencia de Sfrp1, un modulador negativo de metalloproteasas, la degeneración de los fotorreceptores sea mayor así como observamos en los ratones rd10;Sfrp1^{-/-}. Esto apoyaría la hipótesis que Sfrp1 podría ser clave en regular las conexiones entre fotorreceptores y otros tipos celulares (i.e. glía de Müller), favoreciendo así su supervivencia.

Para determinar si esta hipótesis es correcta y verificar si la sobre-expresión de Sfrp1 es capaz de ralentizar la degeneración de las células fotorreceptoras de la retina, decidimos llevar a cabo experimentos de sobre-expresión de Sfrp1 en animales rd10. Para ello generamos partículas lentivirales (LV) que nos permitieran expresar Sfrp1 en retinas de ratones modelos para la degeneración de los fotorreceptores. Tras comprobar que estas preparaciones eran eficientes y que la infección de líneas celulares con estos LV llevaba a la producción y secreción de Sfrp1, hemos también puesto a punto la técnica de inyección en el

espacio vitreal estableciendo las condiciones necesarias para poder trasladar nuestra experimentación in vivo. Utilizando técnicas de doble marcaje hemos establecido que los virus se incorporan con una cierta preferencia en la glía de Müller. Esto nos parece una gran ventaja ya que tal vez la actividad de Sfrp1 sea particularmente crítica para el mantenimiento de la conexiones entre este tipo celular y los segmentos externos de los fotorreceptores. Una vez establecido que las partículas lentivirales generadas son efectivas y permiten aumentar los niveles de Sfrp1, inyectamos partículas lentivirales control, LV-GFP, o LV-Sfrp1-GFP en el espacio vitreal de ratones rd10 de 14 días de edad, cuando todavía la degeneración de los fotorreceptores en estos animales no ha empezado. Elegimos esta edad para obtener una buena expresión de Sfrp1 en el momento que la degeneración empieza (aprox. P18), ya que se requieren aproximadamente 48hrs para inducir una expresión elevada de proteína tras infección con LV. Analizamos después los animales al mes de vida (P30) cuando normalmente la gran mayoría de los fotorreceptores en la retinas de ratones rd10 ya ha degenerado. Aunque el numero de animales que hemos analizado hasta la fecha es todavía limitado (n=5), hemos observado que infecciones con LV-Sfrp1 ralentiza la muerte celular de los fotorreceptores. De hecho, la capa de fotorreceptores en retinas infectadas con LV-Sfrp1 presenta por lo menos 6-8 capas de fotorreceptores mientras que la retinas que recibieron LV-GFP solamente presentan solo 3 capas de fotorreceptores.

En base a los resultados que descritos nos gustaría por lo tanto concluir que, por lo menos en ratones, la proteína Sfrp1 representa factor de susceptibilidad para la degeneración de los fotorreceptores. En su ausencia, los fotorreceptores son mas susceptibles a degenerar tras un estimulo adicional como el estress lumínico, mutaciones genéticas o la edad. Alto niveles de Sfrp1 en cambio parece proporcionar una cierta protección frente a la degeneración. La relevancia de estos resultados en humanos necesita ser analizadas. En este momento, seria fundamental determinar si pacientes con RD presentan niveles mas bajos de Sfrp1 ya que variaciones interindividuales de los niveles de expresión de Sfrp1 podrían conferir susceptibilidad o resistencia a la enfermedad y influir en la progresión de la muerte de los fotorreceptores en individuos con mutaciones genéticas definidas. De ser así nuestro datos también apuntan a que una terapia basada en elevar los niveles intra-retinianos de Sfrp1 podría ser beneficiosa y retrasar la perdida de fotorreceptores.

Los resultados descritos en esta memoria han sido presentados en varias reuniones y congresos. Entre ellos cabe destacar las Jornadas organizadas por Fundaluce, los congresos anuales del Ciber de Enfermedades Raras al cual nuestro grupo pertenece, y un Workshop organizado por la Fundación Ramón Areces sobre Distrofias de Retina.

Estos datos son también objetos de los dos siguientes manuscritos que se enviarán en breve

Incidencias y dificultades y estado actual del proyecto.

Como se desprende de la memoria científica, creemos que nuestro proyecto se ha ejecutado con éxito, llevando a conclusiones interesantes que ahora necesitan ser trasladadas al hombre. Este paso es siempre complicado y limitado por las muestras que se pueden analizar. Sin embargo esperamos poder dar este paso en un futuro próximo.

Firmado



Paola Bovolenta

Madrid, 24 de Marzo, 2014