

RESUMEN

Candidato de tesis doctoral: Gisela Edit Miranda

Director de tesis doctoral: Dra. Nora P. Rotstein

Co-director de tesis doctoral: Dr. Luis E. Politi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

“Rol de los lípidos en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de neuronas de retina”

Las enfermedades neurodegenerativas de la retina, como la Retinitis Pigmentosa (RP), se caracterizan por la pérdida de las neuronas fotorreceptoras por apoptosis, que conduce a la ceguera. Pese a la extensa investigación realizada no se ha podido avanzar en su tratamiento; sin embargo, la posibilidad de regeneración neuronal y la identificación de células progenitoras multipotentes (“stem cells”) en la retina (Reh y col., 1998; Tropepe y col., 2000), permiten proponer la combinación de dos enfoques simultáneos para el tratamiento de estas enfermedades: impedir la apoptosis de los fotorreceptores y estimular la proliferación de progenitores neuronales para restaurar las neuronas perdidas. La aplicación de este nuevo enfoque requiere un conocimiento a nivel molecular de los mecanismos de regulación del ciclo celular y de aquellos que posibilitan inducir la diferenciación de progenitores indiferenciados en el tipo neuronal deseado.

En el laboratorio de Neurobiología del INIBBB se ha establecido que dos factores tróficos participan activamente en la regulación del ciclo celular de neuroblastos precursores de fotorreceptores: el Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (GDNF), que aumenta el número de precursores multipotentes y estimula el ciclo celular, y el Acido Docosahexaenoico (DHA) que induce la salida del ciclo celular de los fotorreceptores y estimula su diferenciación (Rotstein y col., 1996; Rotstein y col., 1997; Rotstein y col., 1998; Politi y col., 2001a; Politi y col., 2001b; Insua y col., 2003). Esto indicaría que en conjunto, ambos factores tróficos estarían actuando para definir el número final de fotorreceptores en la retina, a través del control de la proliferación, diferenciación y supervivencia.

Trabajos realizados en el laboratorio nos han permitido establecer por primera vez que la ceramida actúa como segundo mensajero en neuronas de retina de rata, activando la apoptosis inducida por estrés oxidante (German y col., 2006b). Determinamos también que el DHA disminuye los niveles de ceramida para proteger a los fotorreceptores de dicho estrés, modulando la actividad

y/o niveles de la glucosil ceramida sintetasa. Estos hallazgos sugieren que otras enzimas de esta vía, y por consiguiente otros esfingolípidos bioactivos podrían intervenir en el control de la supervivencia, proliferación y diferenciación neuronales.

La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido con importantes funciones biológicas; actúa como molécula señal extra e intracelular, regulando procesos biológicos críticos, como la proliferación, diferenciación, y supervivencia. La ceramida-1-fosfato (C1P) es otro esfingolípido cuyas funciones como regulador de la supervivencia y proliferación celular han sido descubiertas recientemente. La información existente sobre el rol de la S1P y C1P en el sistema nervioso y en la retina es muy escasa. Por ello fueron objetivos centrales de este trabajo de tesis investigar si la S1P y la C1P tienen un papel regulatorio en la proliferación y diferenciación neuronal en la retina.

Existen numerosos modelos animales de las enfermedades neurodegenerativas de la retina que posibilitan evaluar los mecanismos moleculares involucrados en la degeneración, así como terapias para el tratamiento de las mismas. El ratón *rd1* es uno de los animales más usados como modelo de estas enfermedades, ya que presenta una pérdida selectiva, irreversible y rápida de los fotorreceptores. Por estos motivos, elegimos este modelo para estudiar el proceso de degeneración *in vitro* de los fotorreceptores y el efecto del DHA sobre dicho proceso. El hallazgo de que los fotorreceptores de ratones *rd* degeneran por apoptosis durante el desarrollo temprano *in vitro*, y la reciente identificación en nuestro laboratorio de la ceramida y la esfingosina como mediadores claves en la apoptosis inducida por daño oxidante o por ausencia de factores tróficos de los fotorreceptores de retina de rata (German y col., 2006b; Abraham y col., 2009a), nos llevaron a investigar también si estos esfingolípidos tendrían un papel en la apoptosis de los fotorreceptores *rd* durante el desarrollo temprano *in vitro*.

El sistema de cultivo *in vitro* utilizado en nuestro laboratorio posibilita obtener cultivos neuronales puros enriquecidos en neuronas fotorreceptoras y amacrinas a partir de retinas de ratas y ratones de 0 a 2 días de nacidos, y mantenerlas por una a dos semanas en medio químicamente definido. La utilización de estos cultivos permitió analizar los mecanismos moleculares que rigen la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas fotorreceptoras y la modulación de dichos procesos por diversos factores.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue evaluar los efectos de la S1P sobre la proliferación de progenitores de fotorreceptores. Utilizando cultivos neuronales de retina de ratas de día 0, determinamos que la S1P aumentó diversos parámetros indicadores del avance del ciclo celular, como la incorporación de BrdU y la cantidad de figuras mitóticas observadas, lo que sugiere que promueve la proliferación de los progenitores de fotorreceptores en cultivo.

Analizamos además el papel de la S1P en la diferenciación de los fotorreceptores, una vez avanzado el desarrollo *in vitro*. Utilizando inmunocitoquímica y Western Blot establecimos que la S1P promovió la expresión de dos proteínas específicas de este tipo celular, la opsina, que forma parte del pigmento visual, y la periferina, proteína de los discos de los segmentos externos. La estimulación de la expresión de opsina y periferina fue independiente del transporte retículo endoplasmático-Golgi, ya que no se vio afectado por el tratamiento con Brefeldina A (BFA), que bloquea dicho transporte. La S1P también estimuló la formación de rudimentos de los segmentos externos, denominados procesos apicales, y promovió la localización de opsina y periferina en dichas estructuras, proceso bloqueado por la BFA. Estos resultados indican que la S1P tendría una acción a nivel transcripcional, sobre la expresión de opsina y periferina, no alterada por el agregado de BFA, pero su efecto sobre la formación de los procesos apicales requeriría del tráfico de estas proteínas al extremo de los cilios para su localización en los segmentos externos.

Investigamos después si la S1P podría actuar como mediadora de los efectos de diversos factores tróficos sobre los fotorreceptores. En otros tipos celulares, se ha establecido que distintos factores tróficos aumentan los niveles de la S1P. Nuestro hallazgo previo de que el DHA modula la actividad de la glucosil ceramida sintetasa y la similitud de los efectos ejercidos por la S1P con los de GDNF y DHA nos llevó a investigar si estos factores tróficos podrían modular los niveles de la S1P para ejercer sus acciones en las neuronas fotorreceptoras. Determinamos que tanto el GDNF como el DHA requieren de un aumento en los niveles de S1P para producir sus efectos. La inhibición de la esfingosina quinasa 1 (SphK1), enzima involucrada en la síntesis de S1P, con un inhibidor competitivo, el DHS, bloqueó los efectos del GDNF y del DHA sobre la proliferación y diferenciación de las neuronas fotorreceptoras. Evaluamos entonces a través de qué mecanismos el GDNF y DHA afectaban la síntesis de S1P. Para ello, investigamos su efecto en la expresión de la SphK1, mediante inmunocitoquímica y Western Blot. Demostramos que ambos factores tróficos aumentaron la expresión de la enzima y promovieron su localización en la membrana plasmática, mecanismo promovido por otros factores tróficos para activar a esta enzima (Toman y col., 2004). Los resultados obtenidos indican que la S1P sería un mediador de los efectos de los factores estudiados, para promover la proliferación y diferenciación de los fotorreceptores.

Otro de los objetivos de este trabajo de tesis fue evaluar los efectos de la C1P en las neuronas fotorreceptoras de retina. El agregado de C1P a los cultivos neuronales obtenidos utilizando retinas de ratas de día 0 generó un aumento en la proliferación de los progenitores de fotorreceptores. Observamos también que la C1P promovió la diferenciación de estas neuronas a tiempos más avanzados del desarrollo *in vitro*, estimulando la expresión de opsina y periferina, favoreciendo la formación de procesos apicales y promoviendo la localización de dichas proteínas en

los mencionados procesos. Estos efectos de la C1P son muy semejantes a los establecidos para la S1P, e indican que también la C1P podría estar implicada en la regulación del desarrollo de las neuronas fotorreceptoras.

Otro de los objetivos de mi trabajo de tesis fue investigar el avance del proceso de degeneración *in vitro* de los fotorreceptores de ratones *rd1* y el efecto del DHA sobre dicho proceso, comparándolo con el desarrollo de fotorreceptores obtenidos de retinas de ratones salvajes (*wt*). Determinamos que los fotorreceptores de ambas cepas murinas sufren un proceso de degeneración similar, con un aumento progresivo en la apoptosis. Esta apoptosis ocurre por la vía mitocondrial, ya que se observó una disminución en el número de fotorreceptores que presentaron depolarización mitocondrial. El DHA tuvo un efecto protector sobre los fotorreceptores de los ratones *rd*, disminuyendo la progresión de la apoptosis de los fotorreceptores durante el desarrollo temprano *in vitro*. En los fotorreceptores *wt* se observó un comportamiento similar. Investigamos también el proceso de diferenciación de los fotorreceptores en ambas cepas y el efecto del DHA sobre dicho proceso. Determinamos que a medida que transcurrió el tiempo de cultivo se evidenció un aumento en los parámetros de diferenciación de los fotorreceptores *rd*. El DHA estimuló esta diferenciación aumentando la expresión de opsina, la formación de procesos apicales y promoviendo la localización de esta proteína en dichos procesos. Un efecto semejante fue observado en los fotorreceptores *wt*.

Investigamos también la posible participación de la ceramida como mediador en la apoptosis de los fotorreceptores *rd*. Inhibiendo la síntesis de ceramida con Fumonisina B1 determinamos que el bloqueo de dicha síntesis previno la muerte de los fotorreceptores, disminuyendo su apoptosis. Este resultado sugiere que el aumento en los niveles endógenos de ceramida sería necesario para la activación de la apoptosis de los fotorreceptores *rd*. Para discernir si la ceramida y/o el producto de su hidrólisis, la esfingosina, actúan como disparadoras de esta muerte, evaluamos el efecto de un inhibidor de la ceramidasa alcalina, el MAPP, sobre dicha muerte. Establecimos que, al contrario de lo que ocurre en la rata, la inhibición de la síntesis de esfingosina no disminuyó la apoptosis de los fotorreceptores, sino que por el contrario, generó un ligero aumento en dicha apoptosis. Estos resultados permiten proponer que la ceramida, y no la esfingosina, sería un mediador clave en la activación de la apoptosis de los fotorreceptores *rd*.

En conclusión, los principales resultados obtenidos en este trabajo de tesis son:

- La S1P estimula la proliferación de neuroblastos progenitores de fotorreceptores de rata en cultivo.

- La S1P promueve la diferenciación de las neuronas fotorreceptoras *in vitro*, incrementando los niveles de expresión de proteínas de los segmentos externos y estimulando la formación de procesos apicales.
- La formación de los procesos apicales inducida por la S1P y el DHA requiere del tráfico de opsina y periferina al extremo de los cilios para su localización en los segmentos externos.
- El GDNF y el DHA aumentan la expresión de la SphK y promueven su localización en la membrana plasmática, incrementando su actividad para generar un aumento en los niveles de S1P.
- La S1P actúa como un mediador esencial para los efectos del GDNF y DHA sobre los fotorreceptores.

- La C1P estimula la proliferación de los progenitores de fotorreceptores.
- La C1P promueve la diferenciación de las neuronas fotorreceptoras en cultivo.

- El DHA incrementa la supervivencia de las neuronas fotorreceptoras de ratones *rd* y *wt* durante el desarrollo temprano *in vitro*.
- El DHA estimula la diferenciación de las neuronas fotorreceptoras de ratones *rd* y *wt*.
- La apoptosis de los fotorreceptores de ratones *rd* ocurre durante el desarrollo temprano *in vitro* requiere de la síntesis de ceramida pero no de la de su metabolito esfingosina.

SUMMARY

PhD thesis candidate: Gisela Edit Miranda

PhD thesis director: Dra. Nora P. Rotstein

PhD thesis co-director: Dr. Luis E. Politi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

“Role of lipids in the regulation of proliferation, differentiation and survival of retinal neurons”

Neurodegenerative diseases of the retina, such as Retinitis Pigmentosa (RP), are characterized by the apoptosis of photoreceptors, leading to blindness. In spite of extensive research, treatments for these pathologies are still lacking; the accomplished knowledge about neuronal regeneration and the identification of stem cells in the retina (Reh y col., 1998; Tropepe y col., 2000), let us propose the combination of two simultaneous strategies in order to restore lost neurons: to stop photoreceptor apoptosis and stimulate neuronal progenitors proliferation. This approach requires a comprehensive knowledge on the molecular mechanisms that control cell cycle, and the subsequent differentiation of neuronal progenitors into the required neuronal type.

It has been established in our Laboratory of developmental neurobiology in the INIBIBB that two trophic factors actively participate in cell cycle regulation of photoreceptor progenitors: Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF), which promotes multipotent progenitors proliferation; and docosahexaenoic acid (DHA), which induces photoreceptor cell cycle exit and promotes their differentiation (Rotstein y col., 1996; Rotstein y col., 1997; Rotstein y col., 1998; Politi y col., 2001a; Politi y col., 2001b; Insua y col., 2003). Therefore, both trophic factors would define the final number of retinal photoreceptors, through the regulation of their proliferation, differentiation and survival.

Previous work from our laboratory established that ceramide acts as a second messenger in oxidative stress-induced apoptosis in rat retinal neurons (German y col., 2006b). We also determined that DHA decreases ceramide levels to protect photoreceptors from this stress, modulating the activity and/or levels of glucosylceramide synthase. These findings suggest that other enzymes and bioactive sphingolipids could also participate in the regulation of neuronal survival, proliferation and differentiation.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a sphingolipid with important biological functions; it acts as an extra- and intra-cellular signaling molecule, regulating critical biological processes such as

proliferation, differentiation and survival. Ceramide-1-phosphate (C1P) is another sphingolipid whose functions as a survival and proliferation regulator have been recently discovered. However, information regarding the roles of S1P and C1P in the Central Nervous System and in the retina, in particular, is very scarce. Hence, a purpose of this work was to investigate the roles of S1P and C1P in retinal neuronal proliferation and differentiation.

There are many animal models of retinal neurodegenerative diseases that allow studying the molecular mechanisms involved in degeneration and also evaluate possible therapeutic treatments. The *rd1* mice are among the most popular animal models used for these purposes, since they present a selective, irreversible and rapid loss of photoreceptors. Hence, we chose the *rd* mice model to study photoreceptor degeneration *in vitro* and the effect of DHA on this process. The finding that *rd* photoreceptors degenerate by apoptosis during early development *in vitro* and our recent identification that ceramide and sphingosine act as mediators of oxidative stress- or lack of trophic factors- induced photoreceptor apoptosis in rat retina (German y col., 2006b; Abraham y col., 2009a), prompted us to investigate if these sphingolipids might have a role in *rd* photoreceptor apoptosis during early development *in vitro*.

The *in vitro* culture system used in our laboratory allow us obtain pure neuronal cultures enriched in photoreceptor and amacrine neurons, from 0 to 2 days old- rat and mouse retinas, in which cells survive up to two weeks in a chemically defined medium. This culture system provided a useful tool to analyze the molecular mechanisms regulating photoreceptor neurons proliferation, differentiation and survival, and investigate the role of diverse factors on these processes.

One of the purposes of this thesis was to evaluate S1P effects on the proliferation of photoreceptor progenitors. Using PNO rat retinal neuronal cultures we determined that S1P increased several markers of cell cycle progression, such as BrdU uptake and the amount of mitotic figures, suggesting that S1P promotes proliferation of photoreceptor progenitors in culture.

We also analyzed the role of S1P in photoreceptor differentiation. Using immunocytochemistry and Western Blot we established that S1P promoted the expression of two photoreceptor specific proteins, opsin, which forms the visual pigment; and peripherin, a structural protein of outer segment discs. Enhancement of opsin- and peripherin- expression was independent of endoplasmatic reticulum-Golgi transport, since it was not affected by Brefeldin A (BFA), which blocks this transport. S1P also stimulated the formation of rudimentary outer segments, named apical processes, and promoted opsin and peripherin localization in these structures, a process that was blocked by BFA. These results indicate that S1P might act at the transcriptional level to promote both opsin and peripherin expression, which is not altered by BFA, but its effect on apical processes formation, would require the traffic of these proteins to the end of the cilia, to build outer segments.

In different cell types, several trophic factors have been shown to increase S1P levels. Our recent finding showing that DHA modulates glucosylceramide synthase activity (German y col., 2006b), and the similarity of S1P effects with those of GDNF and DHA, led us to investigate if these trophic factors could modulate S1P levels to signal their actions in photoreceptor neurons. We determined that GDNF and DHA required an increase in S1P levels to produce their effects. The inhibition of Sphingosine kinase 1 (SphK1), the enzyme involved in S1P synthesis, with a competitive inhibitor, DHS, blocked GDNF and DHA effects on proliferation and differentiation of photoreceptors, respectively. Then we evaluated through which mechanisms GDNF and DHA affected S1P synthesis. For this purpose, we investigated their effects on SphK1 expression by immunocytochemistry and Western Blot. We demonstrated that both trophic factors increased SphK1 expression and promoted its localization on plasma membrane, a mechanism already demonstrated for other trophic factors to enhance SphK1 activity (Toman y col., 2004). These results suggest that S1P is a mediator of GDNF and DHA to promote photoreceptors proliferation and differentiation.

We also evaluated C1P effect on retinal photoreceptors. C1P addition to neuronal cultures from PNO retinas generated an increase in the proliferation of photoreceptor progenitors. We also observed that C1P promoted photoreceptor differentiation at later time of development *in vitro*, stimulating opsin and peripherin expression, favoring apical processes formation, and promoting the localization of these proteins in these apical processes. C1P effects are similar to those established for S1P, and suggest that C1P could also be implicated in the development of photoreceptors.

One of the purposes of my thesis work was to investigate the progression of the degeneration process in *rd1* mouse photoreceptors *in vitro* and the effect of DHA on this process, and compare it with what occurs in photoreceptors from wild type (*wt*) mice. We determined that photoreceptors from both animal strains suffer a similar degeneration process, with a progressive increase in apoptosis. This apoptosis occurs through the mitochondrial pathway, since less photoreceptors preserving their mitochondrial membrane potential were observed as their time *in vitro* increased. DHA had a protective effect on *rd* photoreceptors, decreasing apoptosis progression during early development *in vitro*; a similar effect was observed in *wt* photoreceptors. We also investigated photoreceptor differentiation in both mouse strains and the effect of DHA supplementation on this process. We established that during an increase in *rd* photoreceptors differentiation parameters was observed with time in culture. DHA stimulated this differentiation: it increased opsin expression, promoted the formation of apical processes and the localization of opsin in these structures. A similar effect was observed in *wt* photoreceptors.

We also investigated the involvement of ceramide as a mediator of apoptosis in *rd* photoreceptors. By inhibiting ceramide synthesis with Fumonisin B1 we determined that blocking this synthesis prevented photoreceptor death, decreasing apoptosis. This result suggests that an increase in ceramide endogenous levels would be necessary to trigger apoptosis in *rd* photoreceptors. To discern if ceramide by itself or together with its metabolite sphingosine were responsible for this death, we evaluated the effect of an alkaline ceramidase inhibitor, MAPP. We established that inhibiting sphingosine synthesis did not decrease photoreceptor apoptosis, as it occurs in rat photoreceptors; on the contrary, this inhibition slightly increased cell death. These results let us propose that ceramide, and not sphingosine, might be a key mediator of apoptosis in *rd* photoreceptors.

The most important results obtained in this thesis are:

- S1P stimulates the proliferation of rat photoreceptor progenitors in culture.
- S1P promotes photoreceptor differentiation *in vitro*, increasing the expression of outer segment-proteins and stimulating the formation of apical processes.
- Formation of apical processes induced by S1P and DHA required the traffic of opsin and peripherin to the end of the cilia, for them to be further localized in the developing outer segments.
- GDNF and DHA increase SphK expression and promote its translocation to the plasma membrane, increasing its activity to produce S1P.
- S1P acts as an essential mediator for GDNF and DHA effects on photoreceptors.

- C1P stimulates proliferation of photoreceptor progenitors.
- C1P promotes differentiation of photoreceptors in culture.

- DHA increases the survival of *rd* and *wt* photoreceptors during early development *in vitro*.
- DHA stimulates differentiation of *rd* and *wt* photoreceptors.
- Induction of apoptosis in *rd* photoreceptors during early development *in vitro* requires ceramide synthesis but not of its metabolite sphingosine.