

Informe final publicable de proyecto

Estudio del rol de BBS4 y las cilias en el desarrollo del tejido adiposo: implicancias para entender la obesidad en la ciliopatía Síndrome de Bardet-Biedl

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156365

06/11/2023

BADANO CABALLERO, José Luis (Responsable Técnico - Científico)

ESCANDE CASTRO, Carlos Jose (Investigador)

GUGGERI AMBROSONI, Lucía (Investigador)

LEPANTO PANIZZA, Paola (Co-Responsable Técnico-Científico)

PRIETO ECHAGÜE, Victoria Esther (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

Resumen del proyecto

Las ciliopatías son una serie de condiciones que se desarrollan cuando la formación o función de un organelo celular llamado cilia primaria se ve comprometida. Entre ellas se encuentra el Síndrome de Bardet-Biedl, causado por mutaciones en genes asociados al BBSoma, un complejo de transporte de componentes hacia la cilia. Los pacientes que presentan este síndrome desarrollan, entre otros síntomas, obesidad temprana. Curiosamente, a diferencia de lo que ocurre en la obesidad que desarrolla la población general, tienen menor incidencia de diabetes y problemas cardiovasculares. Si bien la principal causa de desarrollo de obesidad en pacientes con BBS se trata de un aumento en la ingesta de alimentos, también se ha reportado que los mecanismos de expansión del tejido adiposo se ven afectados. Es por ello que en este proyecto nos propusimos estudiar cómo se da esta expansión cuando el gen *bbs4*, necesario para la formación del BBSoma, y su gen interactivo, *fstl1*, se ven comprometidos. Para ello trabajamos con cultivos de células provenientes de ratones con una mutación para *bbs4* y con larvas de pez cebra con una mutación en *bbs4* o en *fstl1a*. Encontramos que la formación de la cilia primaria y la transducción de señales asociada no se ve afectada en presencia de mutaciones de *bbs4* o *fstl1a*. Sin embargo, la respuesta a nivel del tejido adiposo es diferencial: la acumulación de grasa aumenta cuando se reduce parcialmente la expresión de *bbs4* en base a una mayor diferenciación de adipocitos, mientras que cuando se reduce casi totalmente los niveles de mensajero de *fstl1a* la diferenciación de adipocitos disminuye al igual que la acumulación de grasa. Estos resultados se complementan con datos obtenidos *in vitro* y nos han permitido generar un modelo de acción de *bbs4* y *fstl1* sobre la generación de nuevos adipocitos.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Bioquímica y Biología Molecular / Ciliopatías

Palabras clave: Adipogénesis / Cilias / Bardet-Biedl /

Introducción

Las cilias primarias son organelos presentes en forma ubicua en las células del organismo, cumpliendo funciones de recepción y transducción de señales extracelulares que impactan en la regulación de la homeostasis, proliferación y diferenciación celular. Los pacientes que presentan mutaciones en genes que son necesarios para la formación, mantenimiento o función de la cilia primaria desarrollan afecciones que se engloban bajo el nombre de ciliopatías y presentan síntomas en uno o varios órganos. El síndrome de Bardet-Biedl (BBS) se encuentra dentro de estas condiciones, con mutaciones en genes codificantes para proteínas que participan de un complejo multiproteico denominado BBSoma, cuya función principal es el de transporte de componentes hacia la membrana ciliar, si bien también se les ha asignado funciones extraciliares [1].

Los pacientes con BBS desarrollan síntomas como disfunción renal, degeneración de retina, polidactilia, retardo mental, hipogonadismo y obesidad [2]. En este proyecto nos enfocamos en ésta última patología, que, en las ciliopatías tiene dos componentes principales. Por un lado, la disrupción de la función normal de las cilias presentes en las neuronas de los núcleos del sistema nervioso central que controlan la saciedad, da lugar a un consumo excesivo de calorías [1, 3-6]. A su vez, a nivel periférico, la cilia primaria controla la diferenciación de nuevos adipocitos [7-10]. Es interesante notar que, a diferencia de la población general con obesidad, los pacientes con BBS presentan menos incidencia de complicaciones metabólicas como diabetes tipo II [9, 11]. Este fenómeno se correlaciona con la capacidad de expansión del tejido adiposo y los mecanismos por los cuales esto se lleva a cabo: la expansión por aumento del número de adipocitos (hiperplasia) se asocia a un mejor perfil metabólico con respecto a la expansión por aumento del tamaño de adipocitos existentes (hipertrofia) [12].

Esta información dirige la atención hacia el proceso de generación de nuevos adipocitos a partir de precursores indiferenciados, denominado adipogénesis. Estos precursores residentes en el tejido presentan cilias primarias que luego tienden a reabsorberse durante el proceso de diferenciación [7, 10]. Esta dinámica permitiría la transducción de señales pro-adipogénicas al inicio de la diferenciación (insulina, IGF-1) y la restricción de señales anti-adipogénicas durante la diferenciación (Shh, Wnt). Los genes asociados a BBS han sido relacionados con el proceso de adipogénesis principalmente a través de estudios *in vitro*. Se ha observado que su expresión es máxima luego de la inducción de la diferenciación de los pre-adipocitos y que luego es regulada a la baja durante la diferenciación [8, 10]. Esta correlación nos hace pensar que los genes *bbs* podrían participar de la diferenciación de nuevos adipocitos a través de modificaciones sobre la cilia primaria, si bien puede existir otros mecanismos independientes de la cilia.

Nuestro grupo ha trabajado sobre esta hipótesis y mediante estudios en líneas celulares hemos obtenido evidencias que

indican que existe una nueva vía que regula la adipogénesis en la que participa BBS4 (forma parte del BBSoma) y Fstl1 (una glicoproteína secretada) [10]. Brevemente, la disminución de la expresión de *bbs4* en la línea celular de pre-adipocitos 3T3L1 lleva a un aumento en la diferenciación de adipocitos. Esta función se da a través de la regulación de la expresión y secreción de Fstl1 que sigue el mismo perfil que *bbs4* y que su presencia es requerida al inicio de la diferenciación mientras que su remoción es necesaria en etapas posteriores (Figura Anexa 1 y 2). Fstl1 regularía a su vez la formación de la cilia primaria en las células en diferenciación. Basados en estos antecedentes y a través de este proyecto buscamos confirmar estos resultados en otros sistemas experimentales que además nos permitan evaluar su relevancia funcional y fisiológica, así como profundizar en los mecanismos moleculares.

Teniendo esto en mente planteamos evaluar la capacidad de *bbs4* de regular la adipogénesis así como la formación y función de la cilia primaria en cultivos primarios de células murinas ya sea embrionarias (MEFs) o derivadas de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo blanco (SVCs), ambos sistemas ampliamente utilizados en el estudio de adipogénesis. También analizamos la relevancia funcional de la vía BBS4-Fstl1 in vivo en larvas de pez cebra, analizando la capacidad de expansión del tejido adiposo. Este sistema experimental se ha incorporado más recientemente al estudio de la adipogénesis y permite contribuir con información que relaciona estructura y función de las células en el contexto normal del tejido y el organismo. En ambos casos evaluamos la formación de nuevos adipocitos analizando la presencia de células diferenciadas como por medio de la expresión de marcadores moleculares. También evaluamos la presencia de cilias primarias y la activación de vías asociadas relevantes para la diferenciación. Por medio de estos estudios pudimos confirmar los resultados obtenidos en líneas celulares, validando los sistemas experimentales utilizados, lo cual nos permitirá analizar en el futuro los blancos celulares y moleculares de la vía BBS4-Fstl1. Esto podría dar nuevos datos que permitan contribuir a la comprensión de las diferencias y similitudes entre la presentación de la obesidad en pacientes BBS y la población general.

Metodología/diseño del estudio

Como mencionamos antes, el proyecto se basó en la utilización de modelos celulares e in vivo en el pez cebra. Para profundizar en los mecanismos celulares y moleculares que participan en la adipogénesis con relación a la vía BBS4-Fstl1 utilizamos dos sistemas experimentales en células: cultivos primarios de células murinas embrionarias (MEFs) y células derivadas de la fracción estromal-vascular del tejido adiposo blanco. Este tejido fue extraído de ratones de salvajes o KO para BBS4, ambos de fondo mezclado *c57bl/6* y *129*, de edades entre 20 y 25 semanas, mantenidos con dieta normal ad libitum. Estas células fueron inducidas a diferenciar a través de un coctel de drogas (insulina, dexametasona, IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), rosiglitazona) y analizadas a diferentes tiempos. Para evaluar la presencia de células diferenciadas, realizamos tinciones para detectar la acumulación de lípidos (Oil Red-O o Bodipy). La presencia de cilia en adipocitos en diferenciación la evaluamos mediante inmunofluorescencia para anti-tubulina acetilada y anti-gama-tubulina para marcar la cilia y anti-pparg para identificar los adipocitos. Luego analizamos los preparados mediante microscopía confocal y cuantificamos el largo de las cilias usando ImageJ. El nivel de activación de las vías inducidas por insulina lo evaluamos por medio de la detección de pAKT/AKT y pERK/ERK por western blot. La expresión de marcadores moleculares de diferentes etapas fue evaluada mediante extracción de ARN total y PCR en tiempo real. A partir del tejido adiposo extraído de los ratones pusimos a punto un protocolo para evaluar la cantidad de pre-adipocitos residentes por medio de citometría de flujo a través del marcado con anticuerpos para CD31, CD45, CD34, CD38. Los pre-adipocitos en proliferación se detectaron por medio de anti-Ki67.

La relevancia funcional de la vía BBS4-Fstl1 in vivo la evaluamos en larvas de pez cebra. Para ello utilizamos dos líneas de peces: Fstl1a KO y BBS4 KO. Para evaluar la presencia de cilias primarias fijamos embriones de 12 o 48 hpf, realizamos una inmunofluorescencia para tubulina acetilada, observamos los preparados por microscopía confocal y analizamos las imágenes usando ImageJ. Las larvas de estas líneas fueron crecidas con dieta controlada ya sea estándar o rica en grasas (yema de huevo) entre los 15 y 21 días post-fecundación (dpf). Para analizar la extensión del tejido adiposo marcamos las larvas con el colorante lipofílico Nile Red, adquirimos imágenes en la lupa y cuantificamos áreas y largo de las larvas usando ImageJ. Para evaluar la expresión relativa de marcadores moleculares disecamos la región abdominal de las larvas, realizamos la extracción de ARN total y PCR en tiempo real.

Resultados, análisis y discusión

Análisis de la capacidad de diferenciación de adipocitos en células *Bbs4*^{-/-}.

Comenzamos analizando si las células SVCs de animales *Bbs4*^{-/-} eran capaces de diferenciar a adipocitos. Para ello incubamos SVCs *Bbs4*^{-/-} o SVCs wt en medio basal o en medio con el cóctel de diferenciación y las analizamos a los 10 días en que evaluamos la acumulación de lípidos mediante tinción con Oil Red-O o Bodipy y microscopía de campo claro o

de fluorescencia, respectivamente. Como resultado encontramos que las SVCs Bbs4^{-/-} presentan más tinción con ORO o Bodipy que las SVCs wt. Al evaluar la presencia de cilias primarias en estos cultivos a diferentes tiempos luego de la incubación con el coctel de inducción, encontramos que si bien en células sin inducir no vemos diferencias significativas en el largo ciliar, las SVCs Bbs4^{-/-} presentan cilias más cortas luego de iniciada la diferenciación. A su vez, analizamos por qPCR la expresión de diferentes marcadores moleculares cuya expresión aumenta durante el proceso de diferenciación. En concordancia con los resultados obtenidos por microscopía, en células SVCs Bbs4^{-/-} observamos un aumento de la expresión de Ppar γ y Cebp γ , ambos genes reguladores positivos de la diferenciación, un aumento de la expresión de Scd1, gen codificante para una enzima asociada al almacenamiento de lípidos y una disminución de la expresión de Fabp4, un gen codificante para un transportador de lípidos que ha sido propuesto como atenuador de Ppar γ . Estos resultados muestran que en ausencia de Bbs4 las cilias primarias se forman, si bien son más cortas que en células wt, y que en estas condiciones las células SVCs tienen facilitada la diferenciación. Más aún, nuestros datos muestran que las cilias Bbs4 KO son capaces de responder a la insulina. Si bien hemos intentado analizar la diferenciación de MEFs en ausencia de Bbs4, los resultados no han sido reproducibles, probablemente por tratarse de células con bajo nivel de compromiso hacia la línea de pre-adipocitos.

El aumento en la diferenciación de los cultivos de SVCs Bbs4^{-/-} puede deberse a una mayor presencia de progenitores en el tejido. Para analizar esta posibilidad, pusimos a punto la detección de pre-adipocitos a partir de tejido adiposo de ratones wt por medio de citometría de flujo. Por medio de la detección de CD34, CD38, CD45, CD31 y Ki67 pudimos generar una rutina que permite analizar la proporción de pre-adipocitos en el tejido a partir del cual se realizan los cultivos primarios de SVCs, encontrando un 14.4% de pre-adipocitos, entre los cuales un 1.95% se encuentra en proliferación. En experimentos futuros analizaremos tejido extraído de ratones Bbs4^{-/-}.

Evaluación de la función de Bbs4 y Fstl1a in vivo.

La evaluación in vivo de la función de Bbs4 y Fstl1 la realizamos en pez cebra. Para ello utilizamos la línea bbs4^{-/-} (generada por colaboradores en USA) y la línea fstl1a^{-/-} desarrollada en nuestro laboratorio por medio de CRISPR/Cas9. Vale la pena mencionar que en pez cebra existen dos genes fstl1a y fstl1b, de los cuales fstl1a es el que presentó mayor impacto sobre la formación de la cilia primaria en ensayos de inhibición de función usando morfolinós. Por un lado, analizamos la capacidad de generación de cilias primarias en el mutante de fstl1a en diferentes órganos ciliados por medio de inmunomarcado y microscopía confocal. Observamos pequeñas diferencias en el largo de las cilias en la vesícula de Kupffer entre embriones fstl1a^{-/-} y wt, mientras que no hay diferencias en la cantidad o largo de las cilias primarias en la vesícula ótica o en la fosa nasal. Chequeamos los niveles de ARNm de fstl1a en embriones y observamos un descenso del 50% aproximadamente. Esto sugiere la presencia de un remanente de ARNm que no ha sido degradado. Si bien este ARNm contiene la mutación que genera un cambio de marco (y por tanto no codifica para proteína funcional), se podría estar dando la activación de mecanismos transcripcionales compensatorios que permiten la supervivencia en la línea mutante, como ha sido reportado previamente [13].

A continuación, evaluamos la capacidad de formación de tejido adiposo a los 21dpf en larvas de la línea fstl1a^{-/-} o wt que fueron mantenidas en dos condiciones diferentes de alimentación: dieta estándar o dieta rica en grasas. Observamos que la extensión del tejido adiposo (área de tejido adiposo en imágenes de fluorescencia) relativizada al estadio de las larvas (largo estándar o SL) es menor en las larvas fstl1a^{-/-} con respecto a los wt en ambas dietas. En ambos genotipos se observó un aumento en la extensión del tejido adiposo en la dieta rica en grasas con respecto a la dieta estándar, sin embargo, fue muy interesante encontrar que este aumento fue mayor en las larvas fstl1a^{-/-}. Con el fin de tener una aproximación a los procesos afectados en ausencia de fstl1a, analizamos la expresión de diferentes marcadores moleculares por qPCR en la zona abdominal de las larvas. Es interesante que la expresión de fstl1a en los mutantes es del 20% respecto a la expresión en larvas wt, sugiriendo una mayor degradación del ARNm de fstl1a mutado en estas etapas. Encontramos una disminución en la expresión de marcadores de células en diferenciación pparg1, pparg2 y cebpa en larvas fstl1a^{-/-} en dieta rica en grasas. También encontramos diferencias en la expresión de marcadores de adipocitos maduros: el aumento de la expresión observada con dieta rica en grasas en los individuos wt no se observa en las larvas fstl1a^{-/-}. También analizamos la expresión de marcadores de pre-adipocitos (zfp423 y dlk) pero no encontramos diferencias significativas entre dietas o genotipos. Estos datos sugieren que la menor acumulación de grasa en las larvas fstl1a^{-/-} puede deberse a una menor diferenciación de adipocitos, siendo esto consistente con el rol pro-diferenciación de Fstl1 en los cultivos celulares [10].

Utilizando la misma metodología evaluamos la acumulación de tejido adiposo en larvas de la línea mutante de Bbs4 y wt, mantenidas en dieta estándar o en dieta rica en grasas. Tanto en dieta estándar como en dieta rica en grasas vimos el mismo comportamiento: las larvas bbs4^{-/-} presentan mayor acumulación de grasa que los wt, mientras que las larvas bbs4^{+/-} presentaron una mayor extensión de tejido adiposo que los otros genotipos. Al evaluar la expresión de los

diferentes marcadores utilizados previamente por qPCR, encontramos un aumento en la expresión de pparg1 en la dieta estándar en larvas *bbs4+/-* respecto a wt. Queda por determinar qué ocurre con la expresión de estos marcadores en la línea *bbs4-/-*, lo cual estamos evaluando al momento.

Los resultados obtenidos hasta el momento tanto en cultivos primarios como en pez cebra sugieren que *bbs4* y *fstl1* presentan funciones similares sobre la adipogénesis a las reportadas en la línea celular de pre-adipocitos 3T3L1 [10] y que apoyan nuestro modelo de trabajo. *Bbs4*, si bien cumple funciones en la formación de la cilia primaria, es dispensable para su formación o funcionalidad, por lo que una mutación nula de *bbs4* es permisiva durante la primera etapa de la adipogénesis en que la cilia primaria es requerida para la transducción de las señales de inducción. Esto se puede evidenciar a partir de que tanto en los cultivos primarios como en pez cebra, la mutación nula de *bbs4* permite la diferenciación de adipocitos. Mientras tanto, esta mutación nula favorecería la reabsorción de la cilia en una segunda etapa de la diferenciación, potenciando de esta forma el proceso de diferenciación y dando lugar a una mayor acumulación de células diferenciadas tanto en células como en pez cebra. En el caso de *fstl1*, los ensayos en pez cebra apoyan el rol pro-adipogénico observado en cultivos celulares. El análisis de marcadores moleculares y de la acumulación de tejido adiposo sugiere que frente a un aumento de grasa disponible *fstl1a* favorecería la generación de nuevos adipocitos.

Conclusiones y recomendaciones

En suma, nuestros resultados muestran un rol importante del eje *Bbs4-Fstl1-cilia* en el tejido adiposo, función que puede modular la respuesta antes distintas condiciones de balance energético. En este contexto, conocer en profundidad como estas proteínas y vías están funcionando en las diferentes situaciones será fundamental no solo para entender la presentación de la obesidad en las ciliopatías sino seguramente también brindará pistas clave para entender la obesidad en la población general.

Referencias bibliográficas

1. Novas, R., et al., Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? *FEBS Lett*, 2015. 589(22): p. 3479-91.
2. Forsythe, E. and P.L. Beales, Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2013. 21(1): p. 8-13.
3. Abdul-Majeed, S., B.C. Moloney, and S.M. Nauli, Mechanisms regulating cilia growth and cilia function in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69: p. 165-173.
4. Guo, D.F., et al., The BBSome Controls Energy Homeostasis by Mediating the Transport of the Leptin Receptor to the Plasma Membrane. *PLoS Genet*, 2016. 12(2): p. e1005890.
5. Guo, D.F., et al., The BBSome in POMC and AgRP Neurons Is Necessary for Body Weight Regulation and Sorting of Metabolic Receptors. *Diabetes*, 2019. 68(8): p. 1591-1603.
6. Seo, S., et al., Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(7): p. 1323-31.
7. Forcioli-Conti, N., et al., The primary cilium undergoes dynamic size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. 458(1): p. 117-22.
8. Forti, E., O. Aksanov, and R.Z. Birk, Temporal expression pattern of Bardet-Biedl syndrome genes in adipogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(5): p. 1055-62.
9. Marion, V., et al., Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 10: p. 1820-1825.
10. Prieto-Echagüe, V., et al., BBS4 regulates the expression and secretion of FSTL1, a protein that participates in ciliogenesis and the differentiation of 3T3-L1. *Sci Rep*, 2017. 7.
11. Feuillan, P.P., et al., Patients with Bardet-Biedl syndrome have hyperleptinemia suggestive of leptin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(3): p. E528-35.
12. Tandon, P., R. Wafer, and J.E.N. Minchin, Adipose morphology and metabolic disease. *J Exp Biol*, 2018. 221(Pt Suppl 1).
13. Sztal, T.E. and D.Y.R. Stainier, Transcriptional adaptation: a mechanism underlying genetic robustness. *Development*, 2020. 147(15).

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)