



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD 2ª ANUALIDAD 3ª ANUALIDAD FINAL

Número Expediente: 2010/149

Investigador Principal: Eduardo Soriano García

Otros Investigadores:

Albert Martínez García

Catia Marlene Teixeira Martins

Núria Masachs Janoher

Título Proyecto o subproyecto

Papel Protector de la Reelina en trastornos de adición: identificación de los mecanismos involucrados en la protección de la Reelina

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Papel Protector de la Reelina en trastornos de adición:

Organismo: Fundació Privada Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)

Centro: Fundació Privada Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)

Departamento: Neurobiología del desarrollo y de la regeneración celular

Comunidad Autónoma: Cataluña

Duración: 36 meses

Fecha de inicio: 15/12/2010

Fecha de finalización: 14/12/2013

Año Convocatoria: 2010

Área Temática:

Palabras Clave:



RESUMEN: (Objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2.000 palabras.)

La hipótesis principal que plantea este laboratorio es que los procesos de plasticidad en adultos, y su disfunción en los trastornos psiquiátricos y adictivos podrían ser críticamente controlados por los principales genes de desarrollo que regula la función sináptica. La Reelina es una proteína extracelular esencial para la migración neuronal, la maduración sináptica y la plasticidad sináptica en el cerebro adulto. Recientemente hemos demostrado que los ratones que sobreexpresan Reelina en el cerebro anterior son resistentes a la sensibilidad de la cocaína y a los efectos psicomotores de la administración repetida de cocaína, lo que sugiere que la sobreexpresión de Reelina ejerce un efecto protector contra los comportamientos similares a los maníacos provocados por las drogas psicotrópicas. En esta propuesta, tenemos la intención de seguir investigando el papel protector de la cascada de señalización de Reelina en los comportamientos relacionados con la adicción a las drogas de abuso (cocaína, anfetaminas) y el alcohol, mediante el estudio de varias líneas de ratones transgénicos con diferentes niveles de Reelina y mediante técnicas moleculares. Nos proponemos utilizar varias técnicas *in vitro* e *in vivo*, modelos de señalización de Reelina, para abordar el efecto de Reelina en el bloqueo de los trastornos adictivos. Por otra parte, las bases moleculares y celulares responsables de esta protección serán identificadas, y se realizará un ensayo de cribado de alto rendimiento para la identificación de los compuestos químicos de regulación de Reelina con interés terapéutico (Subproyecto 2).

Esta propuesta tiene como objetivo investigar los siguientes objetivos específicos:

- a) Investigar si la Reelina tiene un papel protector en la adicción a psicoestimulantes y alcohol;
- b) Estudiar si la Reelina imprime una firma de expresión de genes específicos en condiciones basales y después de la administración de drogas psicotrópicas y alcohol;
- c) Para identificar las vías moleculares y celulares implicadas en la función protectora de Reelina en los trastornos relacionados con las toxicomanías;
- d) Para desarrollar un programa de descubrimiento de medicamentos para identificar los compuestos químicos que modulan la vía Reelin (véase el Subproyecto 2).

Por lo tanto, esta propuesta tiene como objetivo proporcionar no sólo los conocimientos fundamentales sobre el papel de protección de Reelina en conductas adictivas y trastornos relacionados, sino también para identificar los compuestos de plomo que regulan la vía de Reelina que sería útil para el desarrollo de nuevas terapias contra los trastornos de la Drogadicción. Por lo tanto, para lograr los objetivos específicos del proyecto, se propone un enfoque coordinado, del proyecto de colaboración de un experto en descubrimiento de drogas y Química Orgánica (Dra. Miriam Royo) y un experto en Neurobiología y Plasticidad (Eduardo Soriano).

Nuestros experimentos demuestran que la ausencia de función de Reelina (animales *Dab1* condicionales) exacerba la adicción a cocaína, y que la sobreexpresión de Reelina protege asimismo contra otros psicoestimulantes, como las Anfetaminas. Además, hemos descubierto una nueva familia de proteínas mitocondriales (*Armcx/Arm10*) que está asociada a G protein-coupled receptors, incluidos los CB1/2 y que regula tráfico mitocondrial. Como nuevo objetivo estamos investigando si las amfetaminas y otras drogas regulan tráfico mitocondrial y su dinámica a través de estas proteínas.



ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: Se adjuntará una separata de cada uno de ellos y se remitirá una copia en formato digital a pndinvestigacion@msssi.es para el fondo bibliográfico de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas

Teixeira C.M, Martín E.D, Sahún I, Masachs N, Pujadas L, Corvelo A, Bosch C, Rossi D, Martínez A, Maldonado R, Dierssen M, **Soriano E.** *Over-expression of Reelin prevents the manifestation of Behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder.* **Neuropsychopharmacology.** (2011). 36:2395-405.

López-Doménech G, Serrat R, Mirra S, D'Aniello S, Somorjai L, Abad M.A, Viturera N, García-Arumí E, , Alonso M.T, Rodríguez-Prados M, Burgaya F, Andreu A.L , García-Sancho J, Trullàs R, Garcia-Fernández J and **Soriano E.** *The Eutherian Armcx genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2.* **Nature Communications.** (2012), 3:814. doi: 10.1038/ncomms1829.

Teixeira M, Kron M, Masachs N, Zhang H, Lagace DC, Martinez A, Reillo I, Duan X, Bosch C, Pujadas L, Brunso L, Song H, Eisch AJ, Borrell V, Howell BW, Parent JM, **Soriano E.** *Cell-autonomous inactivation of the Reelin pathway impairs adult neurogenesis in the hippocampus.* **The Journal of Neuroscience** (2012), 32:12051-12065.

Cotrufo T, Andrés R.M, Ros O, Pérez-Brangulí F, Fuschini G, Muhaisen A, Pascual M, Comella J.X and **Soriano E.** *Syntaxin 1 is required for DCC/Netrin-1-dependent chemoattraction of migrating neurons from the lower rhombic lip.* **European Journal of Neuroscience** (2012), 36:3152-3164

Teixeira CM, Masachs N, Muhaisen A, Bosch C Pérez-Martinez J, Howell B and **Soriano E.** *Transient downregulation of the Reelin pathway during development is sufficient to lead to schizophrenia-like phenotypes.* **Neuropsychopharmacology** (2013), doi: 10.1038/npp.2013.226

Serrat R, López-Doménech G, Mirra S, Quevedo M, Garcí-Fernández J, Ulloa F, Burgaya F and **Soriano E.** *The non-canonical Wnt/PKC pathway regulates mitochondrial dynamics through degradation of the ARM-like domain-containing protein Alex3.* **Plos One** (2013), 8:e67773. doi: 10.1371/ /journal.pone.0067773.

Barbosa D, Serrat R, Mirra S, Quevedo M, Gómez de Barreda E, Àvila J, Bastos ML, Capela JP, Carvalho F and **Soriano E.** *MDMA impairs mitochondrial neuronal trafficking in a Tau- and Mitofusin2/Drp1-dependent manner.* **Archives of Toxicology.** (2014) Feb 13. PMID:24522274 [Epub ahead of print] In press.

Barbosa D, Serrat R, Mirra S, Quevedo M, Gómez de Barreda E, Àvila J, Bastos ML, Capela JP, Carvalho F and **Soriano E.** *The mixture of "ecstasy" and its metabolites impair mitochondrial fusion/fission equilibrium and trafficking in hippocampal neurons, at in vivo relevant concentrations.* **Toxicological Sciences** (2014), 139:407-20



OBJETIVOS

PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

A.- Hipótesis y Objetivo principal.

La hipótesis de este proyecto es que la activación de la cascada de LA Reelina (una vía de señalización que participa en la plasticidad estructural y funcional de las sinapsis) en el cerebro anterior podría ser una herramienta nueva y eficaz para el tratamiento de la adicción a las drogas de abuso y alcohol.

En esta propuesta, tenemos la intención de seguir investigando el papel protector de la cascada de señalización de Reelina en el consumo de drogas de abuso y del alcohol mediante el estudio de varias líneas de ratones transgénicos con diferentes niveles de Reelina y utilizando herramientas moleculares específicas. Por otra parte, las bases moleculares y celulares responsables de esta protección serán identificadas, y mediante un ensayo de cribado de alto rendimiento se identificarán compuestos químicos que modulen la vía de la Reelina y que por tanto son de potencial interés terapéutico (Subproyecto 2).

B.- Objetivos Específicos.

- 1.- *¿Tiene la Reelina un papel protector en la adicción a las drogas psicoestimulantes y alcohol?*
- 2.- *¿Induce la Reelina una firma de expresión de genes específicos en condiciones basales y después de la administración de drogas psicotrópicas y alcohol?*
- 3.- *Identificación de las vías moleculares y celulares implicadas en la función protectora de Reelina en los trastornos relacionados con las toxicomanías.*
- 4.- *Cribado de alto rendimiento (High-Throuput) para identificar compuestos que modulan la vía de señalización de la Reelina (véase el Subproyecto 2).*

C.- Impacto de la propuesta de investigación y su relación con los objetivos prioritarios.

Impacto científico: Nuestro objetivo es determinar cómo la Reelina, una proteína de matriz extracelular homeostática fundamental para el desarrollo de las funciones del abuso de drogas y la protección del alcohol. Por lo tanto, nuestro proyecto debe proporcionar los conocimientos fundamentales sobre los mecanismos de protección y regulación genética que controlan estos procesos adictivos.

Impacto Biomédico: Las drogas psicotrópicas y la adicción al alcohol son enfermedades que afectan a millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, su fisiopatología molecular es sólo apenas entendida, y por lo tanto, las terapias actuales tienen una eficacia limitada. Dado el papel de Reelina en la plasticidad neuronal y la neurotransmisión, nos propusimos investigar cómo esta proteína protege contra estos trastornos. Es importante destacar que, la sobreexpresión de Reelina protege contra los trastornos relacionados con adicción a la cocaína (véase más arriba). Vamos a ampliar los estudios realizados con otras drogas psicotrópicas como anfetaminas, así como el alcoholismo. La identificación de los mecanismos básicos de señalización que generan protección contra estas enfermedades deben sugerir importantes dianas moleculares para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Impacto social y económico: Nuestro equipo de neurobiólogos (el grupo de E. Soriano) y químicos (el grupo de M. Royo) establecerá una plataforma de detección de alto rendimiento para identificar los compuestos bioactivos que modulan la vía de la Reelina. Los hits identificados se analizarán para su farmacodinámica, toxicidad, biodistribución, etc. Esperamos que estos resultados sean fundamentales en el descubrimiento de



fármacos indicados para el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas y con ello proporcionar beneficios sociales y económicos relevantes.

D. - Relación de los principales objetivos de la convocatoria.

Este proyecto tiene por objeto establecer las bases biológicas y químicas de nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de las toxicomanías. Por otra parte, en el proyecto se investigará la participación de la vía Reelina en adicción a las drogas, mediante el análisis de varios modelos de ratón con distintos niveles de expresión de Reelina.

Así, el proyecto se ajusta bien a los principales objetivos de la convocatoria # 3 y # 4, tuvo como objetivo investigar nuevos mecanismos patogénicos implicados en la adicción, así como la investigación sobre los nuevos enfoques terapéuticos.

Por otra parte, el proyecto tiene como objetivo investigar si la sobreexpresión de Reelina protege contra los trastornos del comportamiento causados por una variedad de drogas como las anfetaminas y el alcoholismo (objetivos de la convocatoria # 5 y # 6). Si, como se espera, la cascada de Reelina protege contra todos estos comportamientos y drogas, nos gustaría proponer que los reguladores químicos de la vía de Reelina pueden ser una terapia eficaz para una amplia gama de enfermedades asociadas a las drogas adictivas más comunes, incluyendo el alcohol.

ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto)

1 .- ¿Tiene la Reelina un papel protector en la adicción a las drogas psicoestimulantes y alcohol?

Nuestros experimentos han demostrado que la sobre-expresión de Reelina en animales transgénicos protege completamente contra las manifestaciones psiquiátricas asociadas al consumo de cocaína (hiperactividad, sensibilización y PPI). En la actualidad estamos llevando a cabo 2 tipos de experimentos en este apartado:

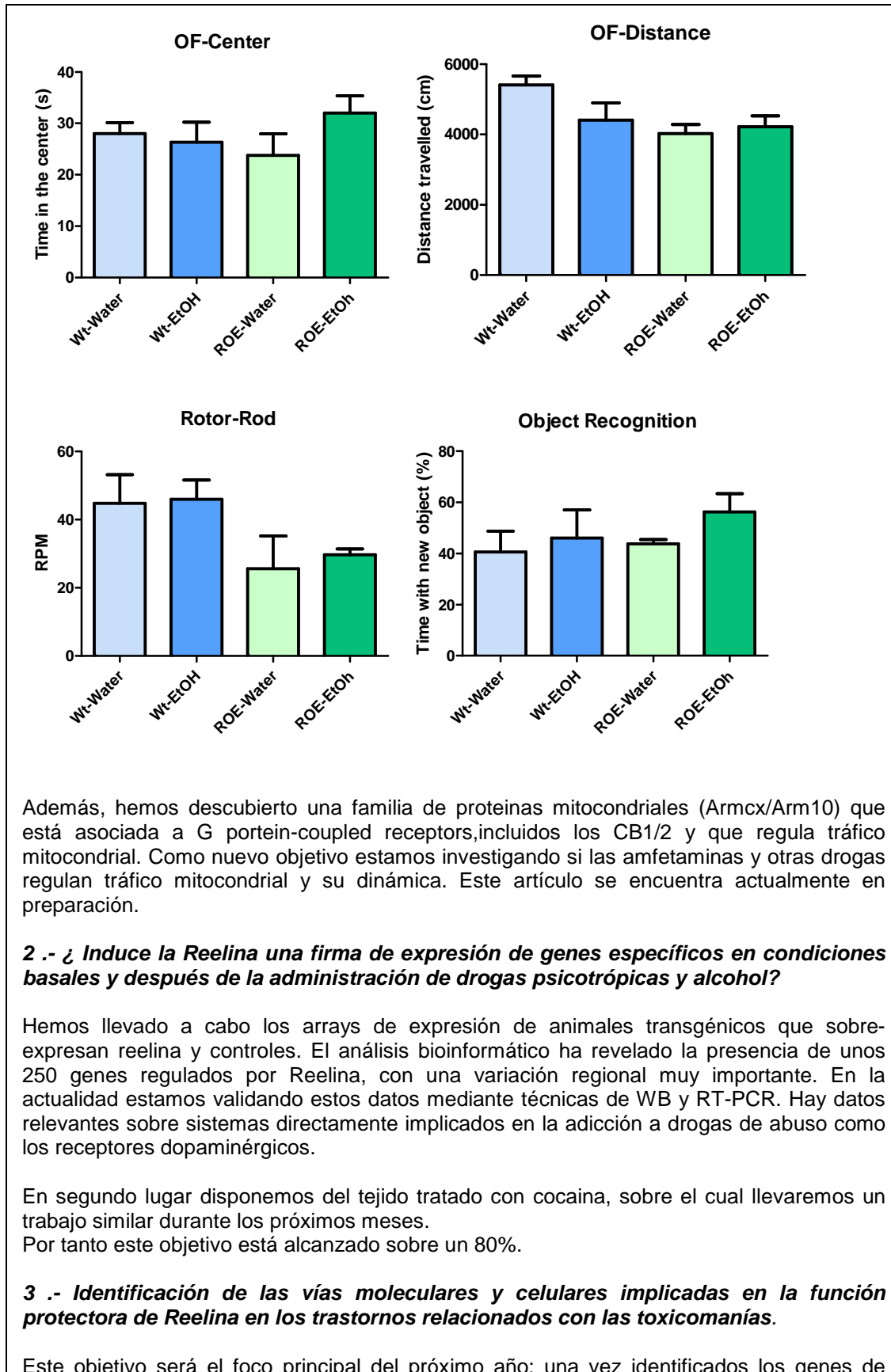
- Comprobar si la ausencia de función de Reelina (animales Dab1 condicionales) exacerba la adicción a cocaína.
- Comprobar si la sobreexpresión de Reelina protege asimismo contra otros psicoestimulantes, como las Anfetaminas.

Estos 2 objetivos ya han sido resueltos con resultados positivos (Teixeira et al., 2011). Además, hemos corroborado estos datos mediante la generación y utilización de una nueva cepa de ratón, floxed DAB1, que demuestra el experimento contrario: que la disminución del pathway de Reelina acelera los cambios comportamentales, asociados a adicción a psicoestimulantes. (Teixeira et al., 2012, 2013).

Por el contrario, los experimentos en los que los ratones han sido tratados con alcohol, no muestran ninguna diferencia. Los métodos empleados han sido los siguientes: Hijos de madres consumidoras de alcohol durante el periodo de gestación provoca el síndrome de alcoholismo fetal (FADS); dicho síndrome provoca un conjunto de anormalidades relacionadas con un mal desarrollo cerebral provocando hiperactividad, déficit de atención, problemas de aprendizaje y memoria, problemas sociales, ansiedad y depresión.

El método experimental realizado fue el siguiente; a hembras gestantes de ratón se les suministró alcohol al 10% durante todo el embarazo y sus crías fueron sometidas a un batería de pruebas de comportamiento: Rotor-rod, Open field y object recognition test. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, indicando que en este caso la Reelina no protege de estas alteraciones.

A continuación les adjuntamos los gráficos con los datos obtenidos





interés intentaremos demostrar su relevancia funcional mediante el empleo de lentivirus con secuencias de interferencia o cDNAs de sobreexpresión.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

PROYECTADO

1.-¿Tiene la Reelina un papel protector en la adicción a las drogas psicoestimulantes y al alcohol?

1.a. ¿Modula la Reelina la esquizofrenia o otros trastornos del estado de ánimo?

1.b. ¿Los niveles de Reelina controlan los comportamientos asociados a drogas de abuso y alcohol?

EJECUTADO

Nuestros experimentos han demostrado que la sobre-expresión de Reelina en animales transgénicos protege completamente contra las manifestaciones psiquiátricas asociadas al consumo de cocaína (hiperactividad, sensibilización y PPI). En la actualidad estamos llevando a cabo 2 tipos de experimentos en este apartado:

- Comprobar si la ausencia de función de Reelina (animales Dab1 condicionales) exacerba la adicción a cocaína.
- Comprobar si la sobreexpresión de Reelina protege asimismo contra otros psicoestimulantes, como las Anfetaminas.

Estos 2 objetivos ya han sido resueltos con resultados positivos (Teixeira et al., 2011). Además, hemos corroborado estos datos mediante la generación y utilización de una nueva cepa de raton, floxed DAB1, que demuestra el experimento contrario: que la disminución del pathway de Reelina acelera los cambios comportamentales, asociados a adicción a psicoestimulantes. (Teixeira et al., 2012, 2013).

Por el contrario, los experimentos en los que los ratones han sido tratados con alcohol, no muestran ninguna diferencia comportamental entre los animales WT y los ratones sobre-expresantes de Reelina of Dab1 nulos.

Además, hemos descubierto una familia de proteínas mitocondriales (Armcx/Arm10) que está asociada a G portein-coupled receptors, incluidos los CB1/2 y que regula tráfico mitocondrial. Como nuevo objetivo estamos investigando si las amfetaminas y otras drogas regulan tráfico mitocondrial y su dinámica.

Por el momento hemos descubierto que el MDMA (extasis) y sus metabolitos regulan tráfico mitocondrial, sugiriendo un nuevo mecanismo patológico (Barbosa et al., MDMA impairs mitochondrial neuronal trafficking in a Tau- and Mitofusin2/Drp1-dependent manner.

Archives of Toxicology. (2014) In press and Barbosa et al., Ecstasy and its metabolites impair mitochondrial fusion/fission equilibrium and trafficking in hippocampal neurons, at in vivo relevant concentrations. **Addiction Biology** (2014), Submitted.

PROYECTADO

2.- ¿ Induce la Reelina una firma de expresión de genes específicos en condiciones basales y después de la administración de drogas psicotrópicas y alcohol?

2.a. ¿Altera la Reelina los patrones de expresión génica en el cerebro adulto?

2.b. La Reelina da lugar a una firma específica de expresión génica tras la administración de drogas de abuso o alcohol?



EJECUTADO

Hemos llevado a cabo los arrays de expresión de animales transgénicos que sobre-expresan reelina y controles. El análisis bioinformático ha revelado la presencia de unos 250 genes regulados por Reelina, con una variación regional muy importante. En la actualidad estamos validando estos datos mediante técnicas de WB y RT-PCR. Hay datos relevantes sobre sistemas directamente implicados en la adicción a drogas de abuso como los receptores dopaminérgicos.

En segundo lugar disponemos del tejido tratado con cocaína, sobre el cual llevaremos un trabajo similar durante los próximos meses. Este objetivo no se ha podido ejecutar al 100% por falta de presupuesto.

Por tanto este objetivo está alcanzado sobre un 80%.

PROYECTADO

3.- Identificación de las vías moleculares y celulares implicados en la función protectora de Reelin en Drogodependencias.

3.a- Espinas dendríticas y sinapsis como determinantes estructurales de la adicción.

3.b.-Caracterización de los mecanismos moleculares y genéticos Reelina-dependientes que regulan la adicción.

EJECUTADO

Este objetivo se está abordando de la actualidad. Una vez identificados los genes de interés intentaremos demostrar su relevancia funcional mediante el empleo de lentivirus con secuencias de interferencia o cDNAs de sobreexpresión. Por el momento hemos identificado que la Reelina y la GSK3 controlan la formación de espinas dendríticas (Teixeira et al., 2012; Llorens-Martin et al., 2013.)

ACTIVIDADES

PROYECTADAS

EJECUTADAS

EN CASO DE FINANCIACIÓN DE ESTANCIA AVALADA POR EL NIDA:

- **Objetivos alcanzados**
- **Actividades realizadas vinculadas con el proyecto**
- **Duración de la estancia**

APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS. (En caso de memoria final)

No se han obtenidos resultados que puedan ser aplicados directamente. Los estudios que se han llevado a cabo muestran protección con la proteína Reelina, pero ésta es de alto peso molecular. En el futuro, si se identifican compuestos bioactivos, estos podrían ser de utilidad práctica.

TRANSFERENCIA Y DIFUSIÓN DE RESULTADOS A LA CIUDADANÍA: ACCIONES LLEVADAS A CABO. (En caso de memoria segunda anualidad y final)

Los resultados se han difundido en las publicaciones mencionadas en la memoria, así como en Congresos y conferencias.

Aunque se han mantenido contactos con varias empresas, éstas consideran que los resultados son prematuros y por lo tanto aún no transferibles.



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO. (En caso de memoria final)

Nuestra intención en principio es proteger los hibridomas generados dentro de una patente que también proteja el sistema de evaluación (screening), ya que al final creemos que este último tendrá suficientes modificaciones que permitirán su protección con respecto a lo ya descrito en ensayos de estas características. Si esto no fuera posible al haber usado alguna herramienta comercial y no haber podido evitarla, entonces se realizaría la protección intelectual de los hibridomas y los correspondientes anticuerpos monoclonales. Por otro lado, los péptidos híbridos generados en el proyecto, si muestran carácter modulador también generarían una patente de moduladores de la acción de reelina. Dada la fuerte vocación de translación de este proyecto, la protección intelectual de las distintas herramientas generadas es un paso indispensable para una futura translación del mismo. En el estadio actual del proyecto se está completando una primera fase para poder en breve empezar a realizar acciones de protección intelectual principalmente focalizadas en los hibridomas y anticuerpos monoclonales generados y su uso en el sistema screening que se está desarrollando. Una vez realizada esta protección se procederá a la búsqueda de potenciales partners industriales que puedan ayudar a financiar parte del proyecto específicamente la relacionada con el desarrollo de nuevos moduladores de reelina (de hecho ya se han realizado primeros contactos con algunas empresas que han mostrado interés), en contrapartida a una licencia de los resultados protegidos. Paralelamente se iniciarán la preparación de manuscritos para publicación en revistas de alto índice de impacto (*J. Med. Chem., Chem. Sci., J. Am. Chem. Soc. y Angew. Chem. Int. Ed.*).

OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O PENDIENTES DE RESOLUCIÓN: importe, procedencia y aplicación

SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS: organismo, convocatoria y cantidad.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección pninvestigacion@msssi.es la presente memoria.

En Barcelona. a 05 de Febrero de 2014

Eduardo Soriano García
INVESTIGADOR PRINCIPAL