

SPINAL NEURAL TUBE CLOSURE DEPENDS ON REGULATION OF SURFACE ECTODERM IDENTITY AND BIOMECHANICS BY GRHL2

Presentado por: L. Alameda Calvo¹, I. Pascual Laguna¹

¹Carrera de Biomedicina, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid

Autores: Evanthia Nikolopoulou¹, Caroline S. Hirst^{1,3}, Gabriel Galea¹, Christina Venturini², Dale Moulding¹, Abigail R. Marshall¹, Ana Rolo^{1,4}, Sandra C.P. De Castro¹, Andrew J. Copp¹ & Nicholas D.E. Greene¹

¹ Developmental Biology and Cancer Programme, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, United Kingdom.

² UCL Infection and Immunity Division, UCL Pathogen Genomic Unit, UCL Cruciform Building, Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom.

³ Horizon Discovery, 8100 Cambridge Research Park, Cambridge CB25 9TL, United Kingdom.

⁴ Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Avenida Professor Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal.

INTRODUCCIÓN

La neurulación recoge los procesos de formación del tubo neural, finalizando con el cierre de ambos extremos (craneal y caudal). En dicho proceso intervienen una cascada de mecanismos moleculares y factores extrínsecos que, en desequilibrio generan defectos embrionarios como la espina bífida. En este estudio, se analiza el cierre del tubo neural en la región caudal del embrión de ratón.

OBJETIVOS

- Investigar el mecanismo por el cual el factor de transcripción Grhl2 regula la neurulación a partir de la falta o la sobreexpresión de dicho gen humano, en modelo *Mus musculus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron dos modelos, con mismo fenotipo, de ratón: con sobreexpresión (Axd) o falta de expresión (Grhl2)

-Estudio de sobreexpresión: Axd/Axd, con control: +/-

-Estudio de falta de expresión: Grhl2^{-/-}, con control: Grhl2^{+/+}

Los embriones estudiados se encuentran en los días 8.5 y 9.5 del periodo embrionario.

1. Mediciones del Poro Neural Posterior (PNP)	2. Western blot	3. Elección de genes de estudio	4. Hibridación <i>in situ</i>	5. Inmunofluorescencia
Medición de la longitud de la abertura del tubo neural en la región sacro-caudal del embrión en E9.5	Técnica utilizada para comprobar la presencia de Grhl2 mRNA en ambas camadas de ratones, tanto en sobreexpresión como en baja expresión	- Extracción del RNA - PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-PCR) Para confirmar la abundancia del mRNA de Grhl2 en E9.5 - Preparación y secuenciación de la biblioteca de RNA-seq - RNA-seq analysis	Fotografiado por un estereomicroscopio	Detección indirecta de segundo Ac por quimioluminiscencia

RESULTADOS

El exceso o insuficiencia de la expresión del gen Grhl2, inhibe la neurulación de la espina dorsal

La pérdida de función de Grhl2 es asociada con la disminución de la expresión de genes epiteliales como Cdh1 (cadherina)

- La expresión de las proteínas de unión, como la cadherina, modula las propiedades de la red de actomiosina implicada en el movimiento celular y, por ello, en el cierre del tubo neural
- En la Figura 1 se detalla la longitud de PNP.

En la camada del gen sobreexpresado (c-f) se observa una forma alargada y estrecha del PNP en Axd/Axd en comparación con el PNP del control. En cambio, en la camada del gen sin expresar (i-m) se observa la forma alargada también en el embrión de estudio, es decir, en aquel que no expresa Grhl2; corroborando la conclusión n°2

En el embrión de estudio de la camada que sobreexpresa Grhl2, el PNP no está cerrado (f) pero en el control (d) sí se encuentra cerrado.

Por otro lado, en la camada que no expresa Grhl2, el embrión control presenta el PNP cerrado; sin embargo, en el embrión de estudio, el cual no expresa Grhl2, el PNP está cerrado pero de manera desigual.

Como conclusión, en la falta de expresión, el PNP está cerrado de forma irregular, y en la sobreexpresión, el PNP no está cerrado.

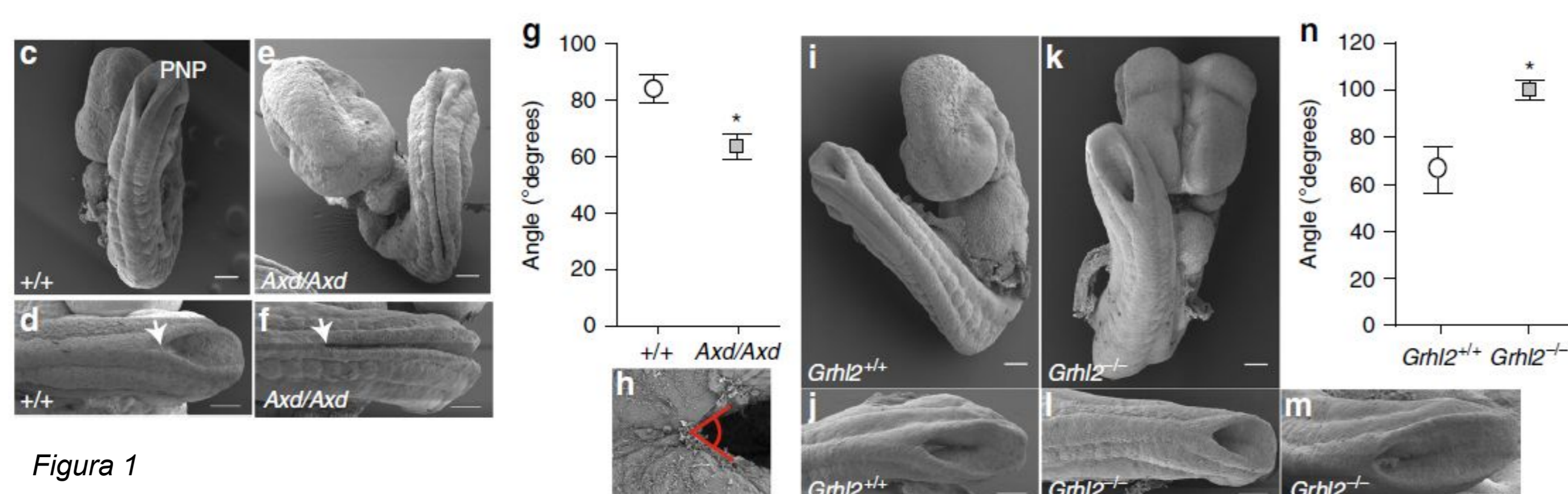


Figura 1

RESULTADOS

Grhl2 regula la firma epitelial molecular

- Con el fin de analizar los genes implicados en la biomecánica del cierre del tubo neural y las enfermedades que derivan en el estudio, se realiza una extracción de RNA completo de los genes expresados en la región sacro-caudal del embrión en E8.5 y 9.5.
- Tras ser analizados en un estudio bioinformático ambas camadas con sobreexpresión e insuficiencia de expresión, se observan 65 genes implicados en exceso de Grhl2 (Figura 2, n)

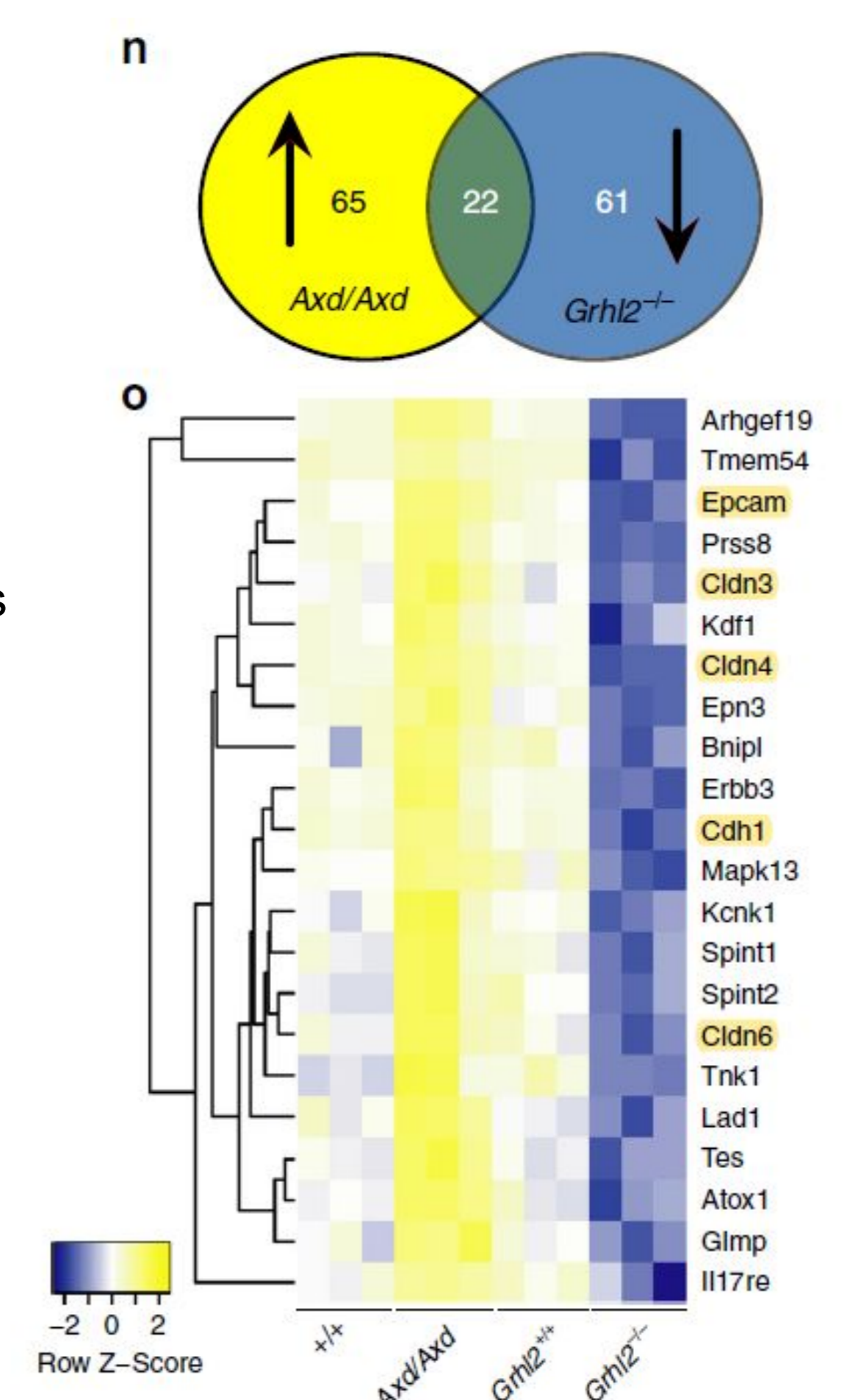


Figura 2

Grhl2 regula la composición de los complejos de la unión apical

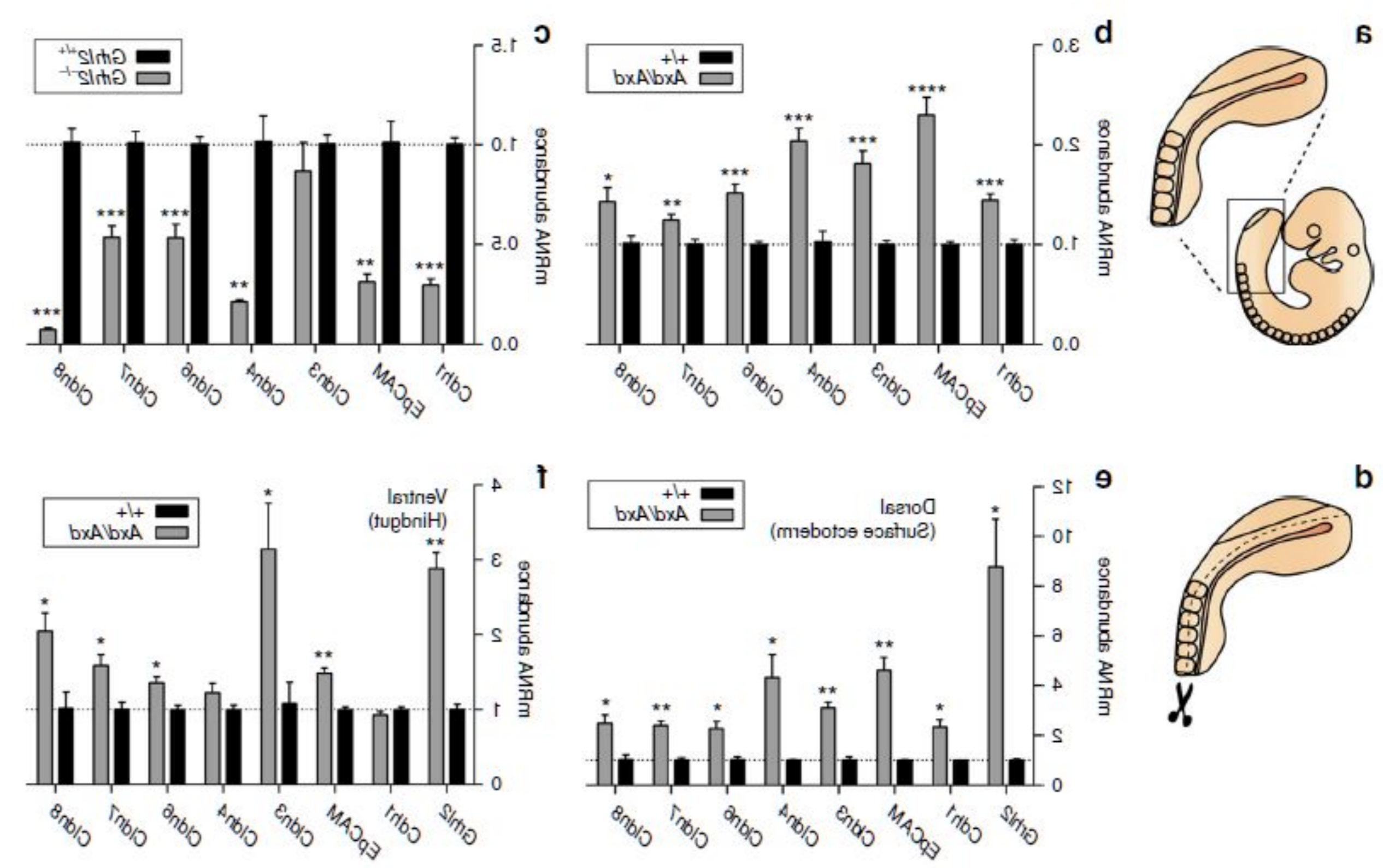


Figura 3

CONCLUSIONES

1. El **ectodermo superficial** del tubo neural es decisivo para la correcta neurulación por la presencia del factor de transcripción Grhl2; así pues, no está presente en el neuroectodermo
2. Tanto la **falta** como la **sobreexpresión** de Grhl2 originan defectos en el cierre del tubo neural ó NTDs, como espina bífida.
3. La alteración de las **propiedades biomecánicas** de las células implicadas en la neurulación afectan a las fuerzas implicadas en el plegamiento del ectodermo superficial y, por tanto, del cierre del tubo neural.
4. El ectodermo superficial es "debilitado" a falta de Grhl2 y "fortalecido" en sobreexpresión, originando defectos en la neurulación en ambos casos