



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO DE FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:
“CAPACIDAD REGULADORA DE LA SECUENCIA *PMP22h-SE*. ¿UNA DIANA TERAPÉUTICA PARA LA ENFERMEDAD CHARCOT-MARIE-TOOTH TIPO 1A?”

Alumno/a: Beltrán Sáenz, Laura

Fecha: Julio 2019

Director/a

Dr./a. Ana Aguirre Escobal

Curso Académico

2018/19

INDICE

1. RESUMEN/SUMMARY

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES DEL SN PERIFÉRICO

2.1.1 Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

2.2 DESCRIPCIÓN DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA PMP22 CODIFICANTE

2.2.1 Variabilidad en el gen *PMP22*

2.3 DESCRIPCIÓN DEL SÚPER-INTENSIFICADOR *Pmp22-SE* EN RATA

2.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. DESARROLLO

3.1 ELECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR EXPERIMENTAL

3.2 OBTENCIÓN DE SCs A PARTIR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ASC)

3.2.1 Aislamiento de ASC

3.2.2 Diferenciación de las ASC a células de tipo Schwann utilizando factores de diferenciación

3.3 IDENTIFICACIÓN DEL SÚPER-INTENSIFICADOR *PMP22h-SE* EN HUMANOS

3.4 ANALISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL INTENSIFICADOR *PMP22h- SE* EN EL CONTROL DE LA EXPRESION DEL GEN *PMP22*

3.4.1 Edición del intensificador *PMP22h-SE* mediante CRISPR-Cas9

3.4.2 Transfección de las SCs derivadas de ASC para la edición del intensificador *PMP22h-SE*

**3.4.3 Confirmación de la edición realizada mediante PCR y
secuenciación automática**

3.4.4 Cuantificación de la transcripción del gen mediante RT-qPCR

**3.4.5 Cuantificación del nivel de proteína PMP22 mediante Western
Blot**

4. PLAN DE TRABAJO

4.1 CRONOGRAMA

4.2 PRESUPUESTO ECONÓMICO

5. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La neuropatía hereditaria denominada enfermedad de Charcot-Marie-Tooth Tipo 1A es un trastorno heredable que afecta a al sistema nervioso periférico. La causa genética más frecuente de este trastorno es la duplicación en tándem de una secuencia de 1.4 Mb, en el cromosoma 17, la cual incluye el gen que codifica para la proteína de la mielina periférica 22 (*PMP22*). El exceso de proteína PMP22 perjudica la formación de la mielina que rodea los axones del sistema periférico y altera otras funciones de las células de Schwann.

Un reciente estudio realizado en un modelo de cultivo celular de células de Schwann de rata, ha identificado una secuencia intensificadora denominada *Pmp22-SE*, aguas arriba del gen *Pmp22*, caracterizada como súper-intensificador, porque controla aproximadamente la mitad de la expresión del gen *Pmp22*. Estudios realizados en otros organismos vertebrados apuntan hacia la existencia de secuencias reguladores evolutivamente conservadas, ubicadas aguas arriba del gen *Pmp22*, que mantienen la cromatina abierta y que afectan directamente a su expresión.

En la presente memoria se propone un proyecto de investigación que permitiría conocer si una secuencia reguladora del gen *PMP22* humano, que comparte algunas características con la secuencia de rata *Pmp22-SE*, controla la mayor parte de los niveles de expresión de la proteína PMP22 humana. Para ello, se propone analizar la potencialidad reguladora de esta secuencia, a la que hemos denominado *PMP22h-SE*, analizando si alteraciones en su secuencia inducen cambios en la expresión transcripcional y traduccional del gen *PMP22*. La caracterización de esta secuencia y de su potencial capacidad reguladora del gen *PMP22*, permitiría conocer detalles moleculares relevantes para el desarrollo de potenciales moléculas terapéuticas dirigidas a reducir la cantidad de la proteína PMP22 y, por tanto, a mejorar la sintomatología de CMT1A.

SUMMARY

Hereditary neuropathy called Charcot-Marie-Tooth disease Type 1 is a heritable disorder that affects the peripheral nervous system. The most frequent genetic cause of this disorder is the duplication in a sequence of 1.4 Mb, on chromosome 17, which includes the gene that codes for the protein of peripheral myelin 22 (PMP22). An excess of PMP22 protein damage the formation of myelin surrounding the axons of the peripheral system and other functions of Schwann cells.

A recent study conducted in a cell culture model of rat Schwann cells, has identified an intensifying sequence called *Pmp22-SE*, upstream of the *Pmp22* gene, characterized as a super-enhancer, because it controls approximately half of the expression of the *Pmp22* gene. Studies carried out in other vertebrate organisms point towards the existence of evolutionarily conserved regulatory sequences, located upstream of the *Pmp22* gene, which keep the chromatin open and affects its expression.

In the present assignment a research project is proposed that would allow to know if a regulatory sequence of the human *PMP22* gene, which shares some characteristics with the rat sequence *Pmp22-SE*, controls most of the expression levels of the human PMP22 protein. Therefore, we propose to analyze the regulatory potential of this sequence, which we have named *PMP22h-SE*, analyzing whether alterations in its sequence induce changes in the transcriptional and translational expression of the PMP22 gene. The characterization of this sequence and its potential regulatory capacity of the PMP22 gene would allow us to know relevant molecular details for the development of potential therapeutic molecules aimed at reducing the amount of the PMP22 protein and, therefore, to improve the CMT1A symptomatology.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN), el principal mecanismo de información en el cuerpo, se encuentra dividido en sistema nervioso central (SN central), formado por el encéfalo y la médula espinal, y en sistema nervioso periférico (SN periférico), integrado por el conjunto de nervios que conectan el cerebro y la médula espinal con los músculos y células sensoriales.

El SN está constituido por un sistema de neuronas y de células gliales. Las neuronas están especializadas en la recepción de estímulos y en la conducción del impulso nervioso y se ven complementadas en funciones auxiliares por las células gliales o neuroglía, siendo los oligodendrocitos las células encargadas de la formación de la vaina de mielina en el SN central y las células de Schwann o Schwann cells (SCs) las encargadas de elaborar las vainas de mielina alrededor de los axones en el SN periférico.

La organización general de los axones mielinizados en el SN central y en el SN periférico es similar, debido al papel conservado de la vaina de mielina en la conducción saltatoria; sin embargo, existen diferencias sustanciales en el desarrollo y ensamblaje de la mielina por parte de ambos tipos de células gliales.

Las SCs son las células gliales principales del SN periférico y tienen su origen en las células multipotenciales de la cresta neural embrionaria, las cuales proliferan durante el desarrollo embrionario y generan los precursores de las SCs que, más tarde, dan lugar a SCs inmaduras y finalmente, tras su diferenciación, a SCs mielinizantes o no mielinizantes (Figura 1).

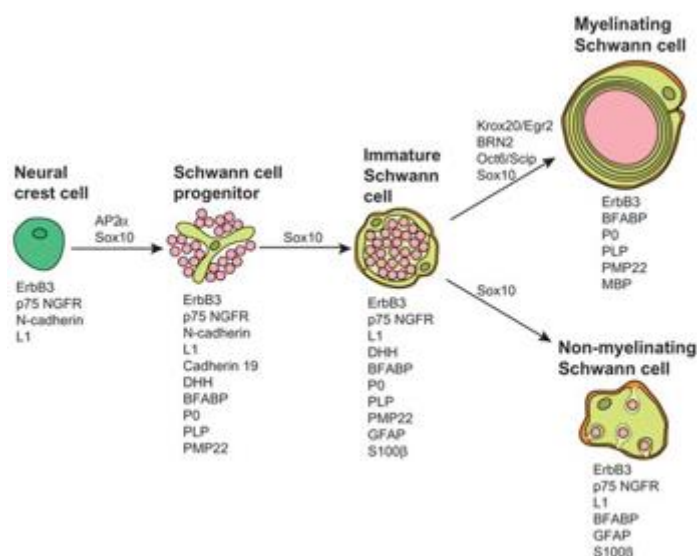


Figura 1. Desarrollo y cascada transcripcional del linaje celular de Schwann (Brady, 2012). Se muestran las diferentes etapas del linaje celular de Schwann y la expresión de los factores de transcripción implicados en cada una de ellas.

A pesar de que el destino hacia SCs mielinizantes o no mielinizantes todavía es desconcertante, se considera que todas las SCs inmaduras comparten el mismo

potencial de desarrollo. La mielinización va a depender de un equilibrio entre diversas señales extrínsecas, que incluyen las presentadas por el axón y la matriz extracelular, como neuregulina (NGR) y laminina, respectivamente, y por una serie de reguladores promielinizantes, como Oct7, Sox10 y Egr2. Sox10 se expresa desde estados iniciales y su expresión, junto con la de Egr2, se requiere de manera continua para el mantenimiento de la vaina de mielina, por lo que ambos se consideran reguladores principales de las SCs mielinizantes (Salzer et al., 2018).

Los dos tipos de SCs desempeñan funciones clave en el desarrollo y función del nervio periférico, como son el apoyo fisiológico, la supervivencia, la protección y la regeneración del SN periférico y la elaboración de las vainas de mielina alrededor de los largos axones (Figura 2).

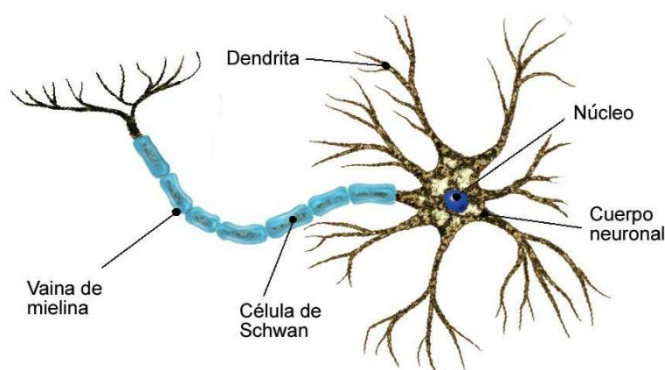


Figura 2. Representación de la mielina rodeando un axón en una neurona del SN periférico (Jimeno, 2013).

Con la mielinización, las SCs se organizan en distintos dominios de membrana, formando así múltiples capas protectoras alrededor del axón, cada una con un conjunto de proteínas y compartimentos comunicantes citoplasmáticos (Figura 3).

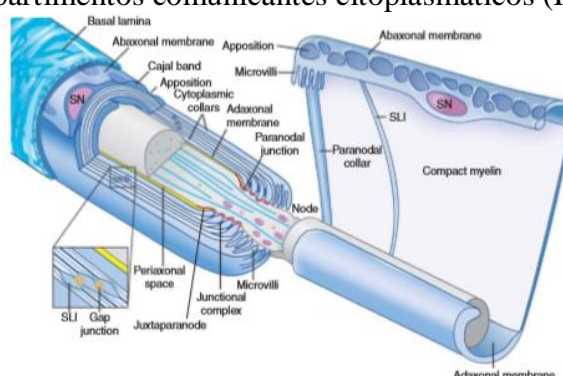


Figura 3. Organización de las SCs mielinizantes (Salzer et al., 2018).

La vaina de mielina es una sustancia lipoprotéica, con un contenido lipídico excepcionalmente alto (70%) y enriquecida en galactosfingolípidos, ácidos grasos de cadena larga y colesterol, el cual es esencial para su ensamblaje. Está constituida por las membranas plasmáticas de la SCs que rodean con su citoplasma a los axones neuronales, las cuales tienen un tamaño mayor o igual a 1 μm , con objeto de potenciar la rápida conducción de los potenciales de acción y ofrecer protección al axón.

Inicialmente, la mielina se forma como envolturas de membrana no compactada y su compactación está mediada por interacciones específicas de proteínas constituyentes. La mielina compacta se encuentra enriquecida por un conjunto pequeño de proteínas, entre las que se encuentran la proteína cero de mielina (P0), la proteína de unión a maltosa (MBP), las cuales participan en dicha interacción, y la proteína 22 de mielina periférica (PMP22) (Figura 4) (Salzer et al., 2018).

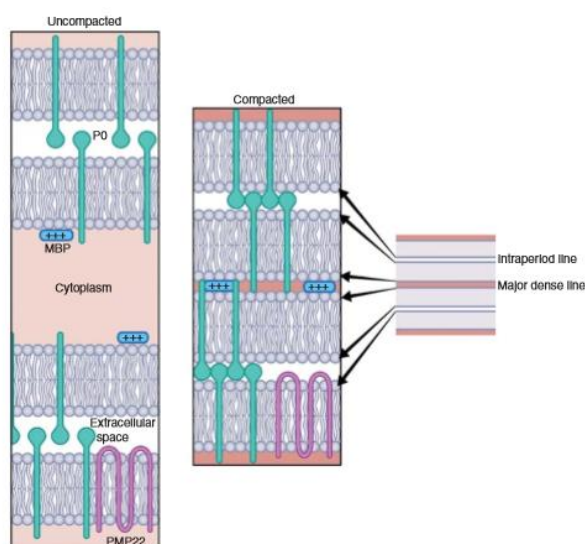


Figura 4. Organización esquemática de la vaina compacta de mielina (Salzer et al., 2018).

2.1 ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES DEL SN PERIFÉRICO

Debido a su compleja estructura de larga distancia, el SN periférico se ve afectado en muchos trastornos neurológicos, siendo los más frecuentes los relacionados con la desmielinización, denominados polineuropatías.

En el SN periférico, las SCs pueden ser fácilmente desestabilizadas por una amplia variedad de condiciones distintas, como lesiones nerviosas, ataques inmunes,

trastornos metabólicos, infecciones microbianas o defectos genéticos, los cuales pueden conducir a la descomposición de la mielina o desmielinización (Palomo et al., 2018). La pérdida de la vaina de mielina afecta a la conducción de las señales a lo largo de los nervios, viéndose disminuida o anulada la velocidad de conducción del impulso nervioso generando un mal funcionamiento de órganos y músculos.

Entre las polineuropatías, podemos encontrar distintos tipos, siendo las más relevantes las neuropatías hereditarias y las neuropatías inflamatorias desmielinizantes. Algunos de los ejemplos más frecuentes son la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) y el síndrome de Guillain-Barré, respectivamente (Katona y Weis, 2018).

2.1.1 Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

La enfermedad de CMT es una neuropatía hereditaria sensitivo-motora (NHSM) transmitida en forma autosómica dominante en la mayoría de los casos, aunque también hay formas que se transmiten de manera autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. CMT es considerado el desorden neurodegenerativo muscular hereditario más común, con una incidencia de 1 de cada 2500 nacidos vivos (Lara-Aguilar et al., 2012).

Entre los tipos más comunes de CMT, está la denominada CMT1, la cual aparece en alrededor del 60-70% de los casos de CMT. CMT1 se caracteriza por debilidad y atrofia muscular distal y por una reducción en la velocidad de la conducción nerviosa (VNC) (Kumar y Priya, 2017).

La causa genética más frecuente que origina el subtipo más común de CMT1, llamado CMT Tipo 1A (CMT1A), es la duplicación en tándem de 1.4 Mb en el cromosoma 17 (17p12), que incluye el gen que codifica para la proteína de la mielina periférica 22 (PMP22), la cual constituye el 2 al 5% del total de la mielina del SN periférico.

La copia extra del gen *PMP22* derivada de la duplicación génica, conduce a una sobreproducción de la proteína PMP22. La relación entre el exceso de proteína PMP22 y los signos y síntomas de CMT1A no está clara, aunque algunas investigaciones sugieren que este exceso de PMP22 podría impedir su correcto procesamiento y conducir a una acumulación de proteína no procesada y no funcional, que perjudicaría

la formación de mielina y alteraría otras actividades de las SCs, generando inestabilidad y desmielinización. Como se ha descrito anteriormente, la pérdida de mielina reduce la capacidad de los nervios periféricos para activar los músculos utilizados para el movimiento y para transmitir información de las células sensoriales al cerebro. Esta pérdida sería la responsable de la atrofia muscular progresiva característica de la patología de CMT1A, en la que se produce el debilitamiento de los músculos inferiores de las piernas, deformaciones de los pies y problemas para caminar, que pueden progresar a atrofia muscular de las manos y dificultades generales en las capacidades motoras (Genetics Home Reference, 2019).

En ocasiones se ha observado que algunos paciente con CMT1A presentan mutaciones puntuales que agregan, eliminan o cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína PMP22. La proteína alterada probablemente se procesa de manera incorrecta y a un ritmo más lento, viéndose afectadas las funciones de las SCs (Genetics Home Reference, 2019).

Otros subtipos de CMT, como el llamado CMT1E, también están asociados con sustituciones y deleciones de aminoácidos particulares en el gen *PMP22*. Así, la mutación más frecuente de CMT1E es el cambio del aminoácido alanina por el aminoácido prolina en la posición de 67 de la proteína (Ala67Pro). Una forma grave de CMT, denominada enfermedad de Dejerine-Sottas o CMT3, también está relacionada con mutaciones en el gen *PMP22* que reducen la cantidad de proteína PMP22 funcional en las células del SN periférico (Genetics Home Reference, 2019).

En estudios realizados por Weterman et al. (2010) encontraron que pacientes con síntomas leves de CMT poseían duplicaciones de 186 o 194 kb aguas arriba del gen *PMP22*, pero sin incluir ninguna secuencia codificante de este gen. Posteriormente, trabajos realizados en modelos de roedores con sobreexpresión del gen *Pmp22* demostraron que la reducción de la transcripción de este gen mejora los síntomas de la neuropatía; sugiriendo que la regulación transcripcional de este gen, podría ser una diana de interés para el desarrollo de potenciales terapias para CMT1A (Pantera et al., 2018).

En conjunto, la información disponible hasta el momento parece apuntar la importancia de un adecuado control en la dosis de la proteína PMP22 y a los efectos

patológicos resultantes de una sobreexpresión del gen *PMP22*. Es por ello que existe una creciente necesidad de comprender los mecanismos reguladores endógenos que establecen la adecuada dosificación de la expresión de este gen y cuya potencial manipulación podría tener interés terapéutico por su posible aplicabilidad para evitar las alteraciones moleculares que conducen a las neuropatías de los nervios periféricos.

2.2 DESCRIPCIÓN DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA PMP22 CODIFICANTE

En humanos, el gen *PMP22* se encuentra en la hebra reversa del cromosoma 17 (-17p11.2-p12) y consta de 5 exones, siendo 4 de ellos codificantes (Figura 5).



Figura 5. Esquema del gen *PMP22* en humanos. *PMP22* incluye 5 exones, numerados del 1 al 5. Las zonas en blanco corresponden a secuencias de exones y UTRs no traducidas; las regiones en color naranja oscuro representan porciones traducidas de exones; en naranja claro, regiones intrónicas (Elaboración propia).

El ARNm de *PMP22* está presente de manera ubicua en todo el cuerpo, encontrándose predominantemente en el SN periférico, en el sistema nervioso central (SN central) riñón corazón, músculo y pulmón. Sin embargo, la expresión de la proteína PMP22 está altamente restringida a unos tipos concretos de células, detectándose en su gran mayoría en las SCs mielinizantes, uniones de células epiteliales y endoteliales, y en neuronas sensoriales y motoras específicas (Verrier et al, 2009).

Como se ha descrito anteriormente, el gen *PMP22* codifica para la proteína 22 de mielina periférica (PMP22), una glutoproteína de 22 kDa que consta de 160 aminoácidos y que presenta cuatro dominios transmembrana glucosilados en el extremo amino terminal (Figura 6).

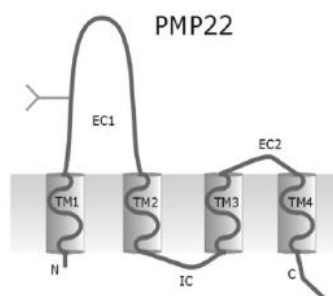


Figura 6. Esquema de la proteína PMP22. La proteína contiene cuatro dominios transmembrana denominados TM1, TM2, TM3 y TM4, respectivamente (Meuleman et al., 2000).

La proteína PMP22 es uno de los componentes principales de la mielina, actuando como una sustancia protectora que cubre los nervios y promueve la transmisión eficiente de los impulsos nerviosos (Genetics Home Reference, 2019). PMP22 desarrolla un papel crucial en la regulación de la síntesis de mielina y en su desarrollo y mantenimiento, proporcionando estabilidad y grosor a la vaina de mielina (Lara-Aguilar et al., 2012).

2.2.1 Variabilidad en el gen *PMP22*

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son sustituciones de nucleótidos de una base que se observan en más del 1% de la población general y representan las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. Pueden tener implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica o alterar el corte y empalme del ARNm, su traducción o la estabilidad y la función de las proteínas (Ramírez-Bello et al., 2013).

Hasta el momento, en el gen *PMP22*, o en secuencias relacionadas, se han detectado alrededor de 8000 SNPs potencialmente implicados en la transcripción del gen o en la traducción y estabilidad de la proteína (*GeneCards* y *Ensembl*). Algunos de ellos se han relacionado con la patología CMT1A, aunque su implicación clínica en ocasiones es incierta (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos de los principales SNPs relacionados con el gen *PMP22*. Se detalla el significado clínico, su localización cromosómica y el cambio de nucleótido (*GeneCards*).

SNP ID	Significado clínico	Chr17pos	Variación
rs1022583382	Significado incierto. CMT1A	15.230.922(-)	C/T
rs104894617	Patogénico. CMT1A y Síndrome Dejerine- Sottas	15.260.681(-)	A/G
rs104894618	Patogénico. CMT1A	15.239.554(-)	G/C

En un estudio realizado por Kumar y Priya (2017) se utilizaron varios métodos de predicción *in silico* para detectar e identificar SNPs no sinónimos (nsSNPs) en la región codificante del gen *PMP22*, que pudiesen alterar la proteína PMP22. Este trabajo identificó cinco SNPs (rs104894617, VAR_006361, VAR_029961, rs104894626 y VAR_006377) que potencialmente podían tener un impacto en la conformación estructural, estabilidad y función de la proteína PMP22, que, por tanto, podrían derivar en CMT1A.

2.3 DESCRIPCIÓN DEL SÚPER-INTENSIFICADOR *Pmp22-SE* EN RATA

En estudios realizados en rata (Pantera et al., 2018) se ha identificado y caracterizado un súper-intensificador *Pmp22* distal, denominado *Pmp22-SE*. Empleando el sistema CRISPR-Cas9 de edición de genoma, este equipo investigador eliminó *in vitro* este intensificador en homocigosis. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que *Pmp22-SE* controla aproximadamente la mitad de la transcripción del gen *Pmp22* en el modelo de cultivo de SCs de rata. El resto de la expresión de *Pmp22* en SC fue atribuida a otros intensificadores distintos de *Pmp22-SE*.

Por otro lado, Jones et al. (2012), mediante cultivos de tejidos e *in vivo* en el pez cebra, usando el análisis de inmunoprecipitación de cromatina de los factores de transcripción Egr2 y Sox10, encontraron varios intensificadores aguas arriba del gen *Pmp22* que mantienen la cromatina abierta y que afectan directamente a su expresión.

Estos y otros trabajos parecen indicar que la regulación de la expresión del gen *Pmp22* podría estar evolutivamente conservada y que la acción de potentes intensificadores podría tener especial relevancia en este control.

En el modelo de rata es donde mejor se ha caracterizado el súper-intensificador *Pmp22-SE*, el cual se encuentra en una gran región genómica de ADN no codificante que contiene seis intensificadores constituyentes separados por menos de 12,5 kb, en los que se encuentran varios sitios de unión para Egr2 y Sox10. Dichos intensificadores constituyentes muestran un enriquecimiento de las características de un intensificador normal, como la hipersensibilidad a la ADNasa I, la acetilación de H3K27ac, y una mayor densidad de los elementos reguladores típicos.

2.4 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En base a todo lo expuesto, nuestra hipótesis de partida es que existe un alto grado de conservación a nivel evolutivo en el control de la expresión del gen *PMP22* y que, por tanto, es posible que el control de la expresión del gen *PMP22* en humanos esté en su mayor parte regulado por un súper-intensificador similar al descrito en rata.

Bajo esta hipótesis, este trabajo tiene como objetivo general proponer una metodología experimental que permitiría averiguar si también en humanos existe un súper-intensificador regulador de la mayor parte de los niveles de expresión de la proteína PMP22. Su identificación y caracterización permitiría conocer detalles moleculares relevantes para el potencial desarrollo de moléculas terapéuticas dirigidas a la potencial reducción de los niveles de expresión de la proteína PMP22 y, por tanto, a una mejora de la sintomatología de CMT1A.

Con este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Obtener células humanas que puedan diferenciarse *in vitro* a SCs, poner a punto el método de diferenciación y aplicarlo a los cultivos primarios.
- 2.- Identificar en humanos una secuencia que *in silico* podría actuar como un intensificador análogo al *Pmp22-SE* de rata

3.- Proponer un método experimental para analizar *in vitro* la función reguladora de esa secuencia sobre la expresión del gen *PMP22* humano.

3. DESARROLLO

3.1 ELECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR EXPERIMENTAL

A pesar del enorme potencial de las células madre embrionarias para la investigación, su utilización se ve muy limitada debido a cuestiones éticas y políticas. Es por ello que las células derivadas de la médula ósea (MSC) han sido propuestas como fuente de células pluripotenciales alternativas al uso de células madre embrionarias. Dichas células son pluripotenciales, se aíslan rápidamente del paciente, se expanden con facilidad *in vitro* y son genéticamente modificables. Sin embargo, las MSC son muy escasas en la médula ósea y su uso en investigación no siempre resulta una alternativa óptima. Por ello, en los últimos años se ha producido una tendencia a la búsqueda de fuentes alternativas de células pluripotenciales, siendo las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASC) una buena opción: al igual que la médula ósea, el tejido adiposo es un derivado del mesodermo, contiene un estroma fácilmente aislable y las células se pueden recolectar fácilmente mediante un procedimiento de liposucción seguro y convencional a partir de tejido adiposo subcutáneo, siendo una fuente de células madre potencialmente utilizables en varios campos. (Arreola, 2011) Además, las ASC tiene perfiles fenotípicos y de expresión génica similares a las MSC y proliferan significativamente más rápido (Fu et al., 2016).

Las ASC tienen la capacidad de llevar a cabo la diferenciación hacia líneas mesenquimales y no mesenquimales, al igual que las MSC. Safford et al. (2002) demostraron la diferenciación de las ASC a linajes neuronales, detectando la presencia de marcadores neuronales tempranos en células diferenciadas *in vitro*.

Debido a todo lo expuesto, en este trabajo proponemos utilizar células ASC, obtenidas a partir de tejido adiposo de humano, procedente de material de desecho de cirugías de liposucción o lipoaspiración, realizadas a pacientes sin enfermedades neurodegenerativas.

Para evitar en lo posible el potencial efecto del genotipo de los SNPs en el gen *PMP22* que presenta cada donante, tal y como se ha descrito anteriormente, proponemos realizar los experimentos partiendo de un pool de ASCs procedentes de, por ejemplo, 10 personas diferentes.

3.2 OBTENCIÓN DE SCs A PARTIR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ASC)

Para la obtención de SCs humanas se utilizará el procedimiento realizado por Arreola (2011). Este método coincide con el llevado a cabo por otros autores, como Fu et al., (2016). Los aspectos más relevantes de este procedimiento son los siguientes:

3.2.1 Aislamiento de ASC

A cada muestra (20 gramos de tejido adiposo obtenido de cada una de las 10 personas donantes) se le añaden 50 mL de PBS-ga PBS estéril con antibiótico (gentamicina a 50µg/mL) y antimicótico (anfotericina B a 0.25µg/mL). Las muestras de tejidos se fragmentan mecánicamente y se realizaran varios lavados con PBS-ga, mezclando por inversión; tras la separación de las fases, se elimina el sobrenadante y se repite el proceso hasta que el pellet quede limpio.

Se realiza una digestión con PBS-ga, con Colagenasa tipo I, 200U/mL (GIBCO®/Invitrogen™) y se incuba a 37°C, con agitación suave, durante 1 hora hasta observar una mezcla más homogénea y espesa. Para el lavado, se añade PBS-ga, se mezcla suavemente y se centrifuga a 2000rpm durante 5 minutos: el pellet se resuspende en 10 mL de PBS-ga. El proceso de lavado y centrifugado se repite 3 veces.

Las células obtenidas se resuspenden en 10 mL de medio MEM-Alpha + GlutaMax™-I (GIBCO®/Invitrogen™) con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% (GIBCO®/Invitrogen™) y antibióticos/antimicóticos.

Proponemos utilizar 150 ul de cada muestra para generar un pool de células ASC de los 10 donantes. Este pool de células se siembra en placas de cultivo a 37°C con 5% de CO₂. Pasadas 72h se les realiza el cambio de medio y se deja expandir el cultivo. Cuando el cultivo llegue al 80-90% de confluencia, las células se levantan utilizando tripsina al 0.25% y se lavan con PBS. Tras la centrifugación a 2000 rpm durante 5

minutos, una porción de las células se congela con glicerol en N₂ líquido y la otra parte se subcultiva sembrando de 3.500-4.00 células por cm² de pocillo.

3.2.2 Diferenciación de las ASC a células de tipo Schwann utilizando factores de diferenciación.

La diferenciación se realiza a partir de células del tercer o cuarto pase. Las células se subcultivan a una densidad de 1×10^5 células/mL en cajas de cultivo de 4 pocillos. Al día siguiente, las células se lavan con PBS y se cultivan en un medio con β -Mercaptoetanol 1mM. Pasadas 24 h, se agrega nuevamente medio de cultivo, al que se le añade ácido trans-retinoico 0,1mM; se deja cultivando 72 h. Finalmente, se les cambia de nuevo el medio a las células, añadiéndole forskolina 5mM, factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-b (bFGF) 10ng/mL, factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA (PDGF-AA) 10ng/mL y 1 β -heregulina humana recombinante 200ng/mL. Las células se mantienen en este medio de 2 a 8 días.

3.3 IDENTIFICACIÓN DEL SÚPER-INTENSIFICADOR *PMP22h-SE* EN HUMANOS

En humanos, hasta el momento no se ha descrito ningún súper intensificador del gen *PMP22* equivalente al descrito en rata. Por ello, en este trabajo proponemos analizar el efecto de una región de control del gen *PMP22* que haya sido descrita como intensificador y que, por sus características, podría resultar análoga al de rata.

En concreto, utilizando las bases de datos *UCSC Genome Browser*, *Genecards* y *Genehancer* se han analizado las secuencias de regulación del gen *PMP22* descritas en humanos. En la figura 7 se muestran las interacciones entre el gen *PMP22* y las secuencias reguladoras que han sido identificadas hasta el momento en humanos y que están recogidas en la base de datos *USCS Genoma Browser*.

Como se puede observar en la Figura 7, la expresión del gen *PMP22* está vinculada con la región reguladora “GH17J015490”, región que a partir de ahora denominaremos como *PMP22h-SE*. Esta región tiene un tamaño de 2,3 kb y se localiza entre las pares de bases 15.490.125-15.492.448 del cromosoma 17. Dado que el gen *PMP22* se localiza entre las pares de bases 15.229.779-15.265.326, el intensificador propuesto se ubica a 224 kb aguas arriba del gen *PMP22*.

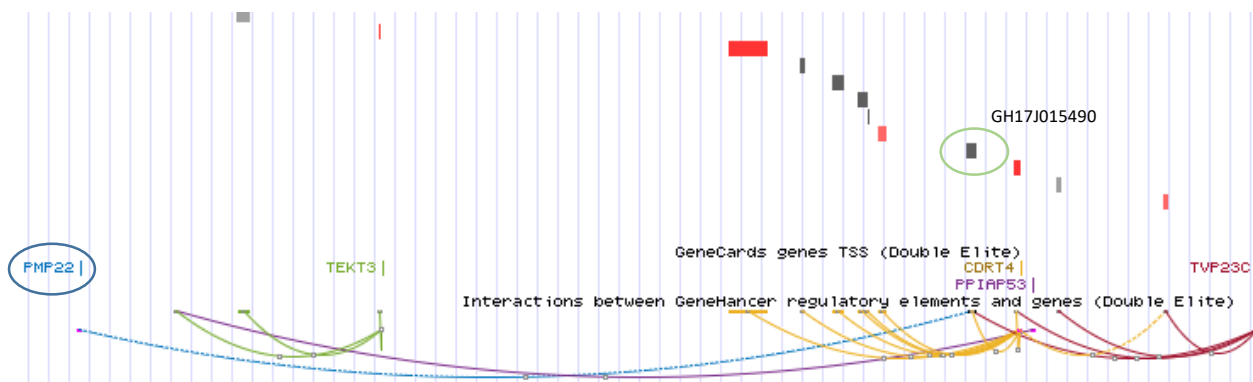


Figura 7. Conexión entre el gen *PMP22* humano y genes distales y los diferentes elementos reguladores que aparecen actualmente en de la base de datos *USCS Genoma Browser*. Se indica la localización del gen *PMP22* (redondeado en azul) y del intensificador seleccionado (redondeado en verde), evidenciándose dicha relación en la línea inferior azul que los une.

De acuerdo con el análisis que hemos realizado con el programa *CONSITE*, en esta región reguladora *PMP22h-SE*, existen dominios de unión para un buen número de factores de transcripción (Figura 8). De acuerdo con la disposición de estos sitios de unión, hemos establecido 3 zonas en la secuencia *PMP22h-SE* que denominaremos A, B y C, respectivamente.

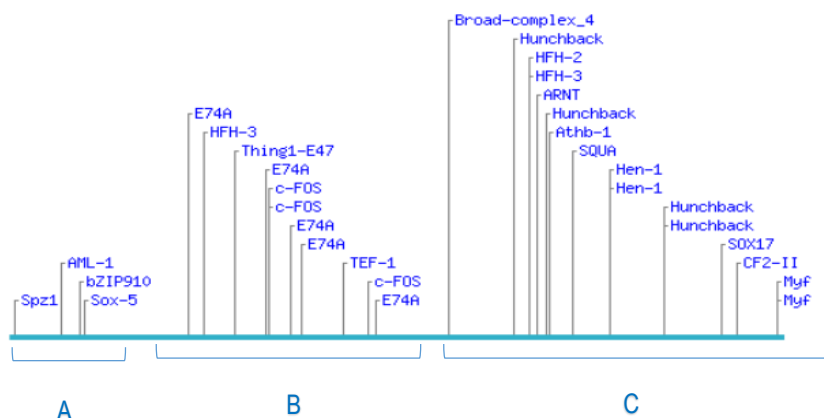


Figura 8. Dominios de unión para los factores de transcripción del intensificador *PMP22h-SE* obtenidos de *CONSITE*. Se puede observar los distintos sitios de unión para los factores de transcripción, tales como Sox-5, SOX17 o TEF-1.

Como ya hemos indicado anteriormente, entre los sitios de unión para factores de transcripción identificados en el súper intensificador de rata destacaban Sox10, Egr2 y Tead1. En la secuencia *PMP22h-SE* de humanos aparecen Sox5 y SOX17, dos miembros de la familia génica Sox, que presentan una elevada homología de secuencia en diversas especies y cuya función está implicada en el control de la función y diferenciación celular de múltiples procesos, tales como la determinación sexual y la neurogénesis (Roisman y Slavutsky, 2014). Aunque en esta región no aparecen secuencias de unión a factores de transcripción importantes, como EGR2 ni TEAD1.

Hemos elegido *PMP22-SE* para este estudio porque consideramos que puede ser un buen candidato como regulador de la expresión de PMP22, fundamentalmente por la solvente asociación gen-intensificador que se ha descrito, en *USCS Genoma Browser*, basada en análisis de eQTLs, capture Hi-C, información disponible sobre coexpresión entre genes y tejidos, coexpresión de los FTs y la distancia a los genes diana (Fishilevich et al., 2017), así como por su localización cromosómica aguas arriba del gen *PMP22*.

3.4 ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL INTENSIFICADOR *PMP22h-SE* EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PMP22*

Para analizar la implicación de *PMP22h-SE* en el control de la expresión del gen *PMP22* y evaluar su función, se propone eliminar esta región reguladora completa o parcialmente mediante el sistema CRISPR-Cas9 y analizar el efecto de estas deleciones sobre la transcripción y traducción del gen *PMP22*.

3.4.1 Edición del intensificador *PMP22h-SE* mediante CRISPR-Cas9

La inducción simultánea de roturas de doble cadena en dos puntos en el mismo cromosoma por los complejos CRISPR-Cas9 puede ser usada para generar la eliminación de la secuencia intermedia (Li et al., 2014).

Para la aplicación de esta metodología al caso que nos interesa, anular la función de la secuencia *PMP22h-SE*, consideramos importante trabajar con las 3 regiones que hemos descrito (las denominadas por nosotros A, B y C) a fin de realizar deleciones parciales o completas la secuencia reguladora. De esta manera, se pretenden evitar

algunos problemas técnicos que pueden surgir cuando la región a editar/eliminar es excesivamente grande. Además, mediante la partición del intensificador en 3 regiones, es posible obtener información más detallada de la potencial función diferencial de los dominios que puedan existir en este intensificador.

Como el enzima Casp9 genera cortes en la hebra duplexa, es posible utilizar diferentes combinaciones de secuencias de gRNA (ARN guía) para eliminar la zona A, la zona B, la zona C o la totalidad del intensificador, e incluso otras combinaciones de partes del intensificador (A/B o B/C, por ejemplo).

Para todas estas ediciones, únicamente se necesitan 4 gRNAs numerados del 1 al 4 en la Figura 9, correspondientes a cortas secuencias de cada una de las regiones del intensificador *PMP22h-SE* indicadas en la Figura 9. La secuencia de cada gRNA se decidirá en su momento, utilizando para su diseño el programa Benchling Life Sciences R&D Cloud, el cual permite establecer la secuencia más adecuada para cada gRNA considerando las secuencias NGG de la secuencia original que se quiere editar.

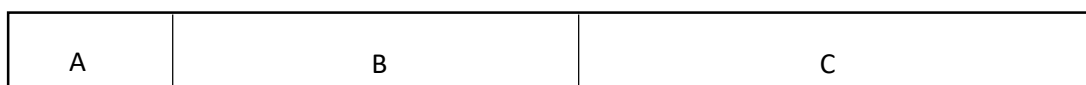


Figura 9. Esquema del intensificador y de las regiones que se utilizan para el diseño de los gRNAs a utilizar para la edición mediante en el sistema CRISPR-Cas9 (Elaboración propia).

En la Tabla 2 se pueden observar las 6 combinaciones de gRNAs que se utilizarán para generar eliminaciones parciales y completas de la secuencia del intensificador *PMP22h-SE*.

Tabla 2. Se muestran los 6 tipos de deleciones que se pueden realizar utilizando los 4 gRNAs.

gRNA	2	3	4
1	Eliminación de A	Eliminación de A/B	Eliminación de A/B/C
2		Eliminación de B	Eliminación de B/C
3			Eliminación de C

3.4.2 Transfección de las SCs derivadas de ASCs para la edición del intensificador *PMP22h-SE*

Una vez obtenidas las células *tipo* SC, mediante diferenciación *in vitro* de células ASC, las células se transfectarán con el plásmido pX330 (Addgene) sin RNAg (control) y con diferentes secuencias de RNAg clonadas. En la Figura 10 se muestran las características principales del plásmido pX330, uno de los que frecuentemente es utilizado para procedimientos de edición mediante CRISPR-Cas9.

Este plásmido dispone de una región específica para la inserción de cada RNAg, además del gen CASP9, el cual está bajo control de un promotor de alta expresión. De esta manera, cada proceso de transfección permite introducir en las células eucariotas simultáneamente todos los elementos necesarios para que se genere la edición del genoma endógeno, en una secuencia específica del ADN celular.

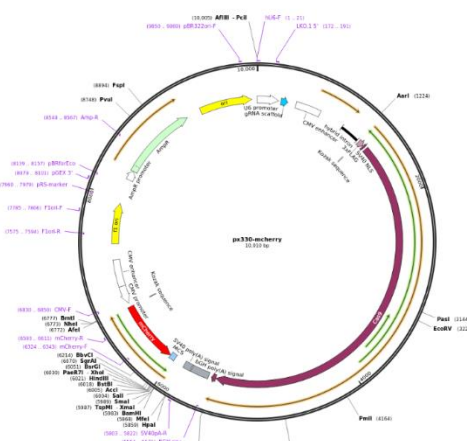


Figura 10. Plásmido pX330 obtenido de Addgene.

Proponemos generar 4 tipos de plásmidos recombinantes, cada uno portador de una secuencia de RNAg de las 4 que se van a utilizar. La edición por delección del intensificador completo o parcial mediante la eliminación de diferentes regiones del intensificador se realizará cotransfectando las SCs obtenidas mediante diferenciación de ASCs, con las diferentes combinaciones de clones indicada en la Tabla 2.

En los experimentos llevados a cabo por Pantera et al. (2018), utilizando de igual manera el sistema CRISPR-Cas9, para el rastreo del efecto de la delección utilizaron 72 clones y en solo 8 de ellos detectaron la eliminación de la secuencia deseada. Por ello, en este proyecto, teniendo en cuenta la proporción de clones seleccionados en

dicho experimento, consideramos que sería necesario obtener unos 96 clones de cada transfección, a fin de obtener unos 10 clones de cada combinación de gRNAs en las que haya sucedido la eliminación deseada en el gen original.

3.4.3 Confirmación de la edición realizada mediante PCR y secuenciación automática

A las 48 h de la cotransfección, se recuperarán las células y se diluirán en medio de cultivo para sembrar en cada uno de los pocillos una media de 1 célula, a fin de obtener los 96 clones de células transfectadas. Tras varios días de crecimiento, cada clon se expandirá utilizando placas de 12 pocillos. Tras el crecimiento, de cada clon, se extraerá el ADN genómico, el ARN y las proteínas. El ADN genómico se utilizará para identificar si se ha producido la deleción deseada en la región genómica de interés. Para ello, se diseñarán cebadores que flanqueen la región que se pretende deleccionar en cada caso, para realizar reacciones de PCR que permitan identificar si el tamaño del fragmento obtenido coincide con el que se espera tras el proceso de edición deseado. Los clones que muestren el tamaño esperado se seleccionarán para, mediante secuenciación automática, confirmar la secuencia de la edición conseguida en el intensificador *PMP22h-SE*.

3.4.4 Cuantificación de la transcripción del gen *PMP22* mediante RT-qPCR

Los niveles de ARNm obtenidos tras la expresión del gen *PMP22* sin edición o con alguna de las deleciones realizadas, se determinarán mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR). Para ello, se extraerá el ARN de cada clon correctamente editado, además del ARN de células control no editadas utilizando TRIzol (Tri Reagent (Thermo Fisher Scientific)). El ARN se convierte en ADNc mediante la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). Los ADNc correspondientes a las moléculas de ARN obtenidas por la transcripción del gen *PMP22* se cuantifican mediante RT-qPCR utilizando el sistema Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) o preferiblemente el sistema TaqMan (Applied Biosystems). La comparación entre el control (no editado) y los niveles medios de transcripción detectados en cada proceso de edición del intensificador *PMP22h-SE*, permitirán

determinar si las deleciones generadas disminuyen significativamente la transcripción del gen *PMP22*.

3.4.5 Cuantificación del nivel de proteína PMP22 mediante Western Blot

Los niveles de proteína PMP22 se cuantificarán mediante Western Blot. Para ello, se extraerán las proteínas de cada clon seleccionado por estar correctamente editado, así como de un cultivo celular sin editar, mediante técnicas convencionales e inhibidores de proteasas. La concentración de proteína total de cada muestra se medirá por el método BCA (kit de ensayo Micro BCA™). De cada clon editado y de la muestra control se cargará la misma cantidad de proteína total en geles de acrilamida/SDS. Tras la electroforesis, se realizará un blotting mediante electrotransferencia y se analizará la cantidad de proteína PMP22 obtenida en cada clon, así como de una proteína que actúa como control interno de carga y que no se vea afectada por la edición (beta-actina, por ejemplo). Las membranas se incubarán con anticuerpos primarios monoclonales para PMP22 (anti-PMP22 anticuerpo (B-6): sc-515280, Santa Cruz Biotechnology) y la proteína control (anti-Actin Anticuerpo (2Q1055): sc-58673 (Santa Cruz Biotechnology)) y con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón (m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 (Santa Cruz Biotechnology)).

4. PLAN DE TRABAJO

4.1 CRONOGRAMA

<u>TAREAS</u>	<u>SEMESTRES</u>			
	1	2	3	4
Adquisición del material necesario para cultivos, anticuerpos, etc.				
Adquisición de las ASC y diferenciación a SCs				
Diseño de CRISPR-Cas9 y transfección para edición del <i>PMP22h-SE</i>				
Verificación de la deleción por PCR y secuenciación				

Análisis del efecto de la edición de <i>PMP22h-SE</i> sobre la transcripción del gen <i>PMP22</i>				
Análisis del efecto de la edición de <i>PMP22h-SE</i> sobre la traducción del gen <i>PMP22</i>				
Repeticiones e imprevistos				
Análisis de resultados				

4.2 PRESUPUESTO ECONÓMICO

MATERIAL	COSTE
Material general: puntas de micropipeta, guantes, tubos eppendorf, pipetas, tampones, reactivos, material de vidrio, etc.	2.500€
Material para cultivos celulares: medios, placas, frascos, antibióticos, nitrógeno líquido, etc.	5.000€
Plásmido pX330 (Addgene)	200€
TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific)	800€
Kit Comercial TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)+ primers+sondas TaqMan	3.000€
MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)	1.000€
RT-qPCR (Servicio de Genómica SGIker de UPV/EHU)	1.500€
Cuantificación de ARN en 2100 Bioanalyzer (Servicio de Genómica SGIker de UPV/EHU)	300€
Kit de ensayo de proteínas Pierce™ Micro BCA™ (Thermo Fisher Scientific)	300€

Anticuerpos primarios: anti-PMP22 (B-6): sc-515280, anti-Actin (2Q1055): sc-58673; anticuerpos secundarios: m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 (Santa Cruz Biotechnology)	6.000€
Reparaciones e imprevistos (20%)	4.000 €
TOTAL	24.000€

5. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD

En este proyecto se plantea trabajar con cultivos primarios de células humanas y realizar modificaciones genéticas en las mismas, así que sería necesario solicitar la autorización del Comité de Ética en la Investigación con Agentes Biológicos y Organismos Modificados Genéticamente de la UPV/EHU.

Para ello, se debería prestar especial atención a los procedimientos que deberán establecerse para garantizar que las personas donantes de tejidos grasos, a partir de los que se obtendrán las células ASC, recibirán la información más adecuada posible sobre los objetivos del proyecto y sobre las garantías de anonimización y de mantenimiento de la confidencialidad de los resultados del trabajo.

Respecto a las condiciones de Bioseguridad, sería necesario garantizar, mediante un análisis sanguíneo, que los donantes están libres de virus patógenos peligrosos y que los procedimientos se realizan en un laboratorio con nivel 2 de contención, y de acuerdo con los protocolos de seguridad propios del trabajo con cultivos celulares. También sería necesario facilitar al comité de bioseguridad información correspondiente a la no peligrosidad para las personas y para el medio ambiente de las ediciones genéticas que se van a realizar.

6. CONCLUSIONES

1.- De acuerdo con estudios previos, la dosis del gen *PMP22* influye en el fenotipo de los humanos, de forma que un incremento en la producción de la proteína PMP22 se ha relacionado con la alteración de las células de Schwann, la desmielinización en el

sistema nervioso periférico y la aparición de la enfermedad neurodegenerativa Charcot-Marie-Tooth de tipo 1A.

Estudios realizados en organismos modelo han permitido identificar una secuencia aguas arriba del gen *PMP22*, la cual controla, en gran medida, la expresión del gen *PMP22*. Se postula que el sistema de control de la expresión del gen *PMP22* podría estar evolutivamente conservado y que en humanos podría existir una secuencia intensificadora análoga que controlaría la expresión del gen *PMP22*.

2.- De acuerdo con los datos actualmente disponibles en las bases de datos del genoma humano, la secuencia que hemos denominado *PMP22h-SE* es un potencial candidato para ser un súper-intensificador en la regulación de la mayor parte de la expresión del gen *PMP22* humano.

3.- Las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, procedentes de material de desecho de cirugías de liposucción o lipoaspiración, podrían diferenciarse *in vitro* para obtener células *tipo*-Schwann que serían de utilidad como modelo celular para analizar la capacidad reguladora de la secuencia *PMP22h-SE*.

5.- La generación de deleciones parciales o totales, mediante CRISPR-Cas9, en la secuencia *PMP22h-SE* del genoma de las células SC diferenciadas *in vitro*, permitiría comprobar el efecto de tales deleciones sobre la expresión del gen *PMP22* y confirmar o desmentir si, a nivel transcripcional y traduccional, la región *PMP22h-SE* funciona en humanos como un súper-intensificador.

6.- La identificación y caracterización de una región genómica que controla la expresión del gen *PMP22* en humanos, permitiría conocer detalles moleculares relevantes y supondría el hallazgo de una potencial diana terapéutica para un mejor manejo de la CMT1A.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arreola A. R. Células mesenquimales humanas diferenciadas *in vitro* a células de Schwann. 2011. Universidad autónoma de Nuevo León.

Brady S., Siegel G., Wayne R. A., Price D. 2012. Formation and maintenance of myelin, en: Brady S., Siegel G., Wayne R. A., Price D. Basic neurochemistry, 8th ed. Elsevier, Chicago, pp. 569-580.

Fishilevich S., Nudel R., Rappaport N., Hadar R., Plaschkes I., Stein T. I., Rosen N., Kohn A., Twik M., Safran M., Lancet D., Cohen D. 2017. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. The Journal of Biological Databases and Curation. (https://www.researchgate.net/publication/317716436_GeneHancer_genome-wide_integration_of_enhancers_and_target_genes_in_GeneCards)

Fu X., Tong Z., Li Q., Niu Q., Zhang Z., Tong X., Tong L., Zhang X.. 2016. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation. Molecular Medicine Reports. 14(2): 1187–1193.

Jiang L., Zhu JK., Liu XL., Xiang P., Hu J., Yu WH. 2008. Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. Neuroreport 19; 1015-1019.

Jimeno A., Blasco A. La función de relación I. El sistema nervioso humano. [Internet] España: Aula2005; 2013. Disponible desde: <http://www.aula2005.com/html/cn3eso/11relaciosn/11snervioses.htm>

Jones E. A., Brewer M. H., Srinivasan R., Krueger C., Sun G., Charmey K. N., Keles S., Antonellis A., Svaren J. 2011. Distal enhancers upstream of the Charcot- Marie-Tooth type 1^a disease gene PMP22. Hum. Mol. Gen- 21(7): 1581-1591

Katona I., Weis J. 2018. Chapter 31- Diseases of the peripheral nerves. Handbook of Clinical Neurology. 145: 453-474.

Kumar A. A., Priya. G. D. 2017. A computational approach to identify a potential alternative drug with its positive impact toward PMP22.

Lara-Aguilar R-A., Ibet C. J-V., Juárez-Rendón K. J., Ethel B. G-A., Barros-Núñez P. 2012. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: actualidad y perspectivas. Arch Neurocién. 2: 110-118.

Li Y., Rivera C. M., Ishii H., Jin F., Selvaraj S., Lee A. Y., Dixon J. R., Ren B. 2014. CRISPR reveals a distal super-enhancer required for Sox2 expression in mouse embryonic stem cells. *Plos One*, 9, e114485.

Meuleman J., Timmerman V., Neis E., De Jonghe P. 2000. Molecular genetics of inherited peripheral neuropathies: who are the actors? *ResearchGate*. 100:171-80.

Palomo I. M., Tamayo C. M., Pérez A. E., Barreira M. A., Varela R. M., Woodhoo A. 2018. Isolation and purification of primary rodent Schwann cells. *Methods Mol. Biol.* 1791:81-93.

Pantera H., Moran J. J., Hung H. A., Pak E., Dutra A., Svaren J. 2018. Regulation of the neuropathy-associated Pmp22 gene by a distal super-enhancer. *Hum. Mol. Genet.* 27(16): 2830-2839

Ramírez-Bello J., Vargas-Alarcón G., Tovilla-Zárate C., Fragoso J. M. 2013. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*. 149: 220-8.

Roisman A., Slavutsky I. 2014. Expresión del factor de transcripción SOX11 su implicancia en el linfoma de células del manto. *Medicina (Buenos Aires)*. 74: 140-146

Safford KM., Hicok KC., Safford SD., Halvorsen YD., Wilkison WO., Gimble JM., Rice HE. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose tissue-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 371-379.

Salzer J. L. 2018. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(8):a020529

Genetics Home Reference. U.S. National Library of Medicine. [Internet]. Montgomery; 2019 [revisado en octubre de 2008, publicado el 9 de jul. de 2019]. Disponible desde: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PMP22#conditions>

Verrier J. D., Lau P., Hudson L., Murashov A. K., Renne R., Notterperk L. 2009. Peripheral Myelin Protein 22 is regulated post-transcriptionally by miRNA-29A. *Glia*. 57: 1265-1279.

Weterman M. A., Van Ruissen F., de Wissel M., Bordewijk L., Samijn JP., van der Pol W. L., Meggouh F., Baas F. 2010. Copy number variation upstream of PMP22 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 18: 421-428.