



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



**FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS  
Y NATURALES**  
Naturaleza, Ciencia y Humanismo

# Corrección de alteraciones en imprinting del cromosoma 15 paterno por medio de la edición genética

García Jimena  
García Yésica  
Gutierrez Antonela  
Olivares Trinidad

# SINDROME DE PRADER-WILLI (PWS)

Es un **trastorno genético** que provoca problemas físicos, mentales y conductuales.

Se considera como la causa genética más común de mortalidad infantil por obesidad.

Se estima que afecta entre 1/10.000 a 1/25.000 recién nacidos, sin distinción por sexo ni etnias.



# SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

**Rasgos faciales distintivos:** ojos con forma de almendra, un estrechamiento de la cabeza en las sienes, la boca hacia abajo y el labio superior fino.



# SÍNTOMAS SEGÚN EDADES

Edad de evaluación	Características para solicitar pruebas de ADN para PWS
Nacimiento- 2 años	<b>Hipotonía</b> Reflejo de <b>succión deficiente</b> que dificulta la alimentación y puede provocar fallas en el desarrollo. Rasgos faciales distintivos
3–6 años	<b>Hiperfagia</b> Capacidad de respuesta deficiente. Estatura pequeña o retardo en crecimiento Hipogenitalismo/hipogonadismo
7–12 años	Retraso global del desarrollo Hiperfagia, <b>obesidad</b> Hipogenitalismo/hipogonadismo
13 años a adultez	<b>Deterioro cognitivo</b> , discapacidad intelectual leve Hiperfagia, obesidad Hipogonadismo Problemas de <b>comportamiento típicos</b> (berrinches y rasgos obsesivo-compulsivos) Estatura baja; <b>manos y pies pequeños</b>

# COMPLICACIONES

## **Complicaciones relacionadas con la obesidad:**

- Diabetes de tipo 2
- Presión arterial alta, colesterol alto y enfermedades cardíacas
- Apnea del sueño
- Riesgo mayor de sufrir una enfermedad hepática y de tener cálculos biliares

# COMPLICACIONES

## Complicaciones por producción inadecuada de hormonas:

- Por **disfunción del hipotálamo** se ven afectadas: regulación hambre-saciedad, temperatura corporal, dolor, equilibrio sueño-vigilia, equilibrio de fluidos, emociones y fertilidad. Aunque se cree que la disfunción hipotalámica conduce a los síntomas de SPW, aún no está claro cómo la anomalía genética causa la disfunción hipotalámica.
- **Esterilidad**: la mayoría de las personas con este trastorno no pueden engendrar hijos.
- **Osteoporosis**. La osteoporosis hace que los huesos se vuelvan débiles y frágiles, por lo que pueden fracturarse fácilmente (hormonas sexuales y hormona del crecimiento).

# COMPLICACIONES

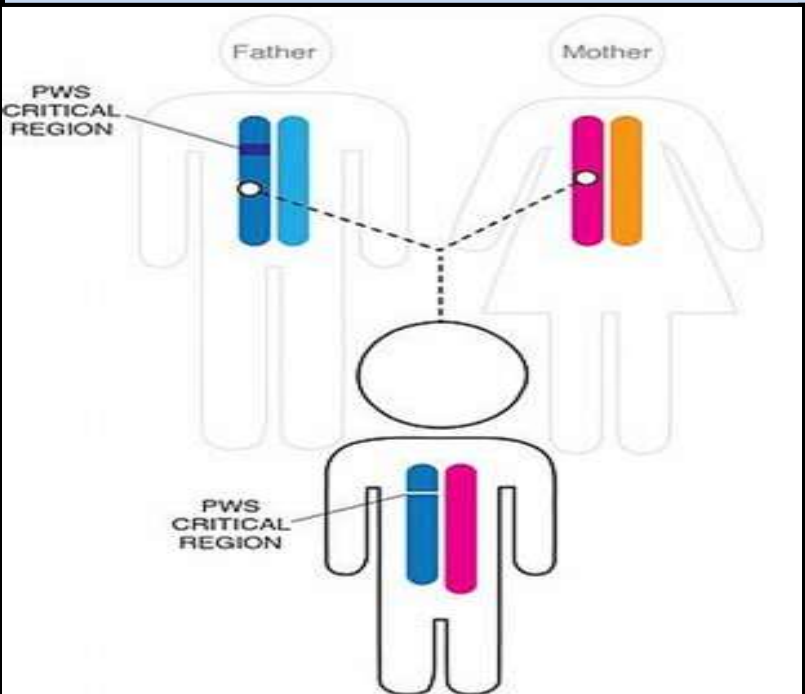
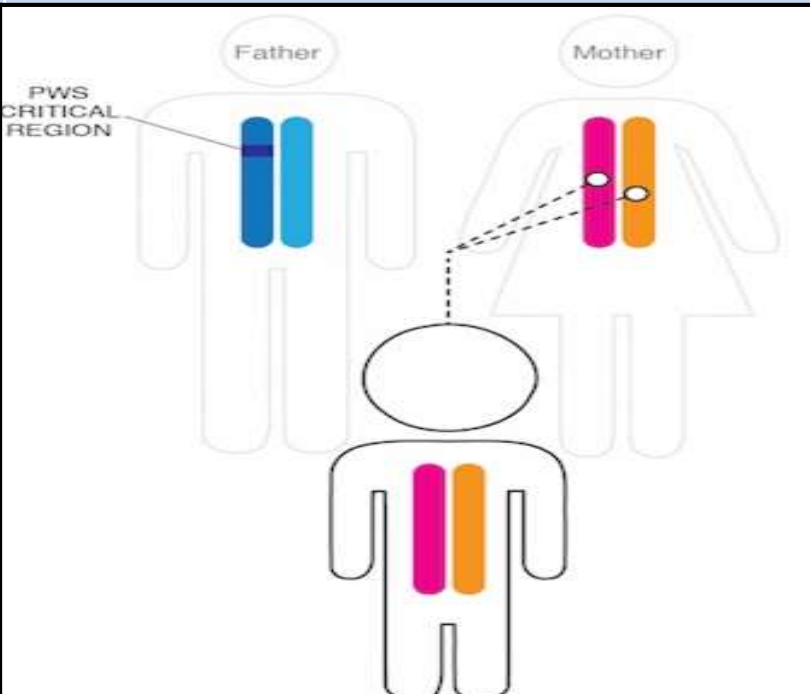
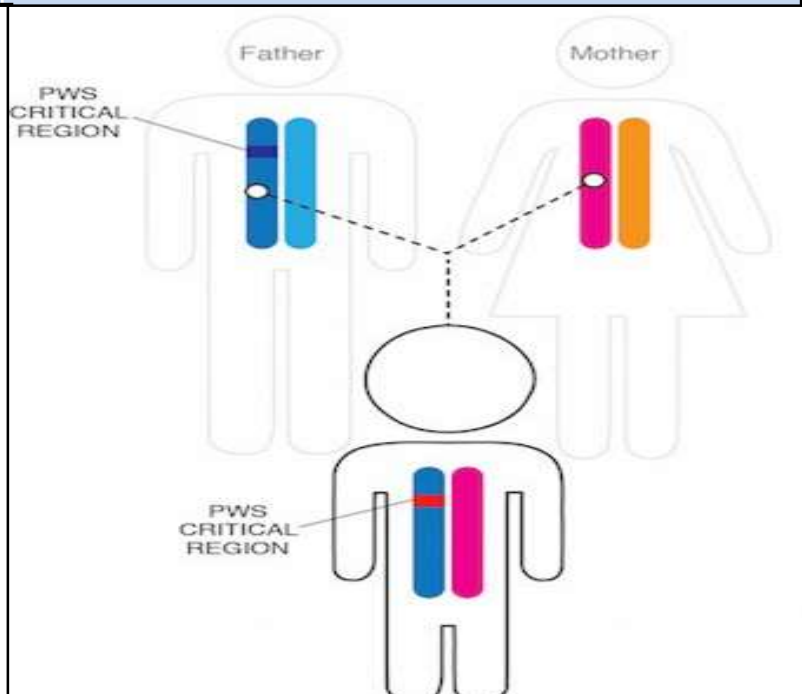
## Otras complicaciones:

- **Efectos de comer en exceso:** puede causar que el estómago se dilate de manera anormal, asfixia o rotura estomacal.
- **Disminución de la calidad de vida:** los problemas de conducta pueden interferir en el funcionamiento familiar, la educación exitosa y la participación social.
- **Problemas con la respiración:** infecciones torácicas, la altura y la actividad física intensa pueden ser peligrosas para los niños con síndrome de Prader-Willi. Esto se debe a que una leve falta de oxígeno puede provocar dificultades respiratorias que pueden resultar fatales.

# CAUSA

Ausencia de la **expresión** de genes heredados del **padre** en la región cromosómica **15q11-q13**

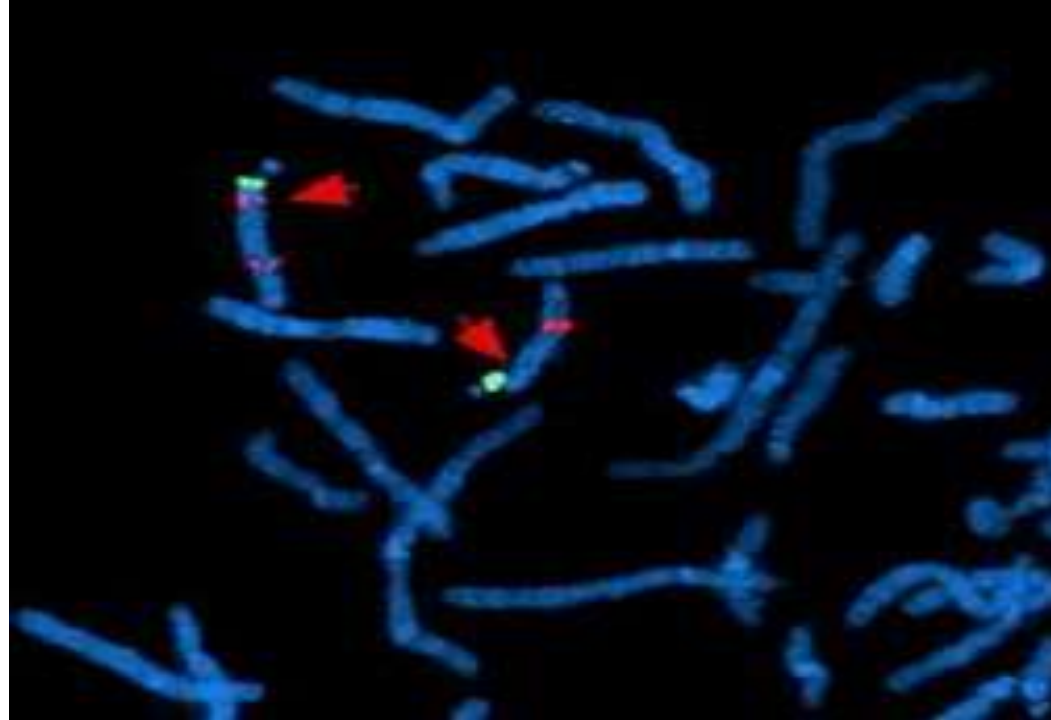
**TIPOS:**

1) PWS por eliminación (70%):	2) PWS por UMD (disomía uniparental materna)(30%):	3) PWS por impresión(imprinting):
Parte del cromosoma 15 que se heredó del <b>padre falta o se elimina</b>	Se hereda <b>dos cromosomas 15 de su madre y ninguno de su padre</b>	<b>material genético del cromosoma 15 paterno (presente) esté inactivo.</b>
		



# DIAGNÓSTICO MOLECULAR

**FISH** es una herramienta clave para confirmar la delección de la región crítica, pero no diagnóstica otras formas de SPW:



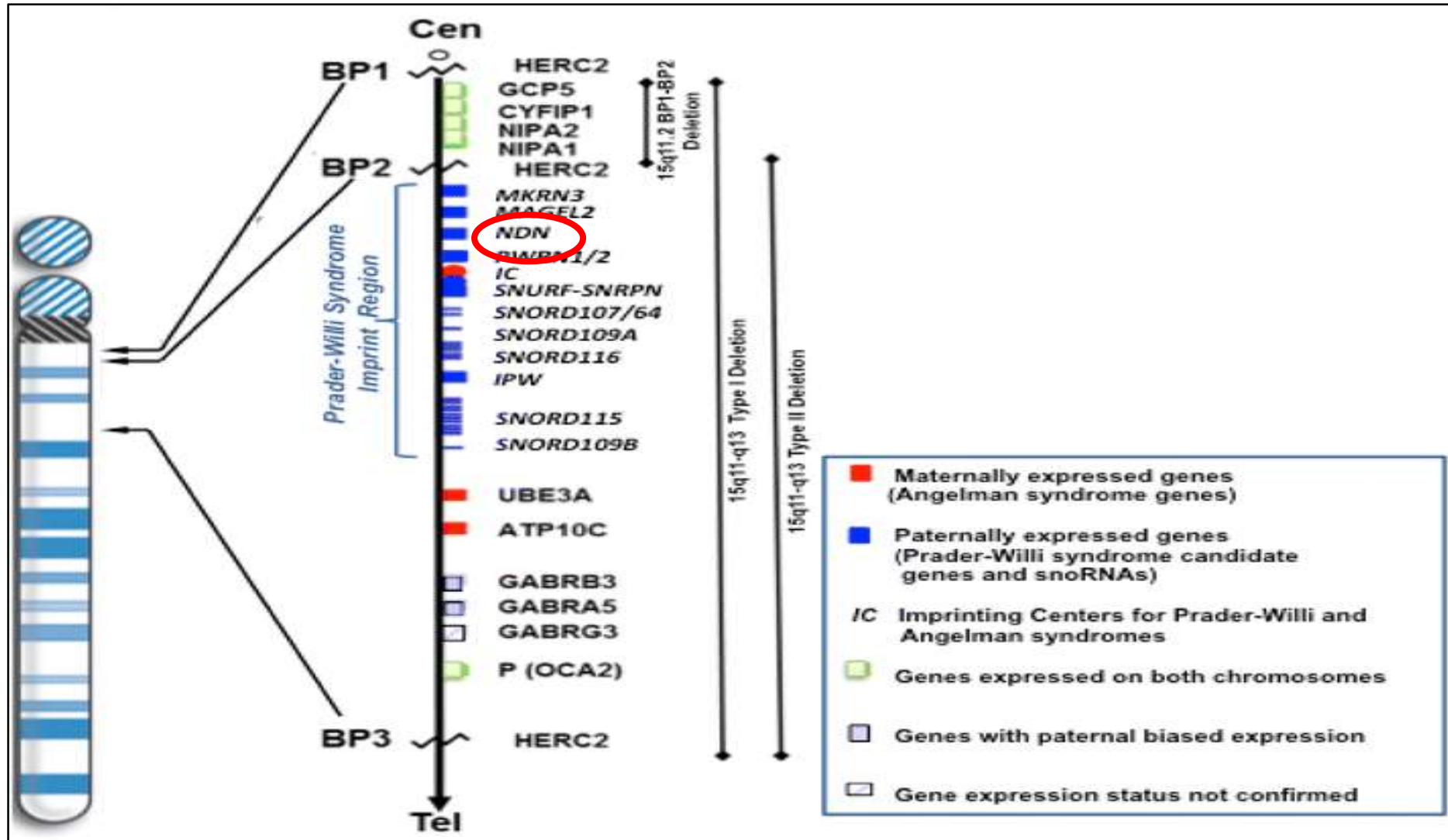
Sonda SNRPN (roja)/PML (roja)/CEP 15 (verde) para Prader-Willi /Síndrome de Angelman. El cromosoma normal (15) exhibe un señal verde (CEP 15) y una señal (PML) roja (sondas de control para verificar la región pericentromérica de 15 y la 15q distal), y una señal de SNRPN roja proximal al centrómero en el brazo largo. El cromosoma 15 con la delección exhibe solo las señales control (PML y CEP 15), le falta la señal roja de la sonda SNRPN (flecha).

# DIAGNÓSTICO MOLECULAR

**TESTS DE METILACIÓN** confirman el diagnóstico si se sospecha de PWS clínicamente pero no identificarán el subtipo genético:

- **Southern Blot (SB):** gran cantidad de ADN necesaria, laboriosidad y el tiempo de espera que requiere la técnica de Southern y la necesidad de trabajar con isótopos radiactivos.
- **Tratamiento con bisulfito (BSS)** y reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**): modificar secuencia de bases cuando se trata con bisulfito: convertir las citosinas en uracilos, excepto las que se encuentren metiladas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite entonces diferenciar el cromosoma paterno y materno según su estado de metilación al variar la secuencia que presentan.

# GENES IMPLICADOS EN PWS



# CRISPR-CAS 9



Agriculture



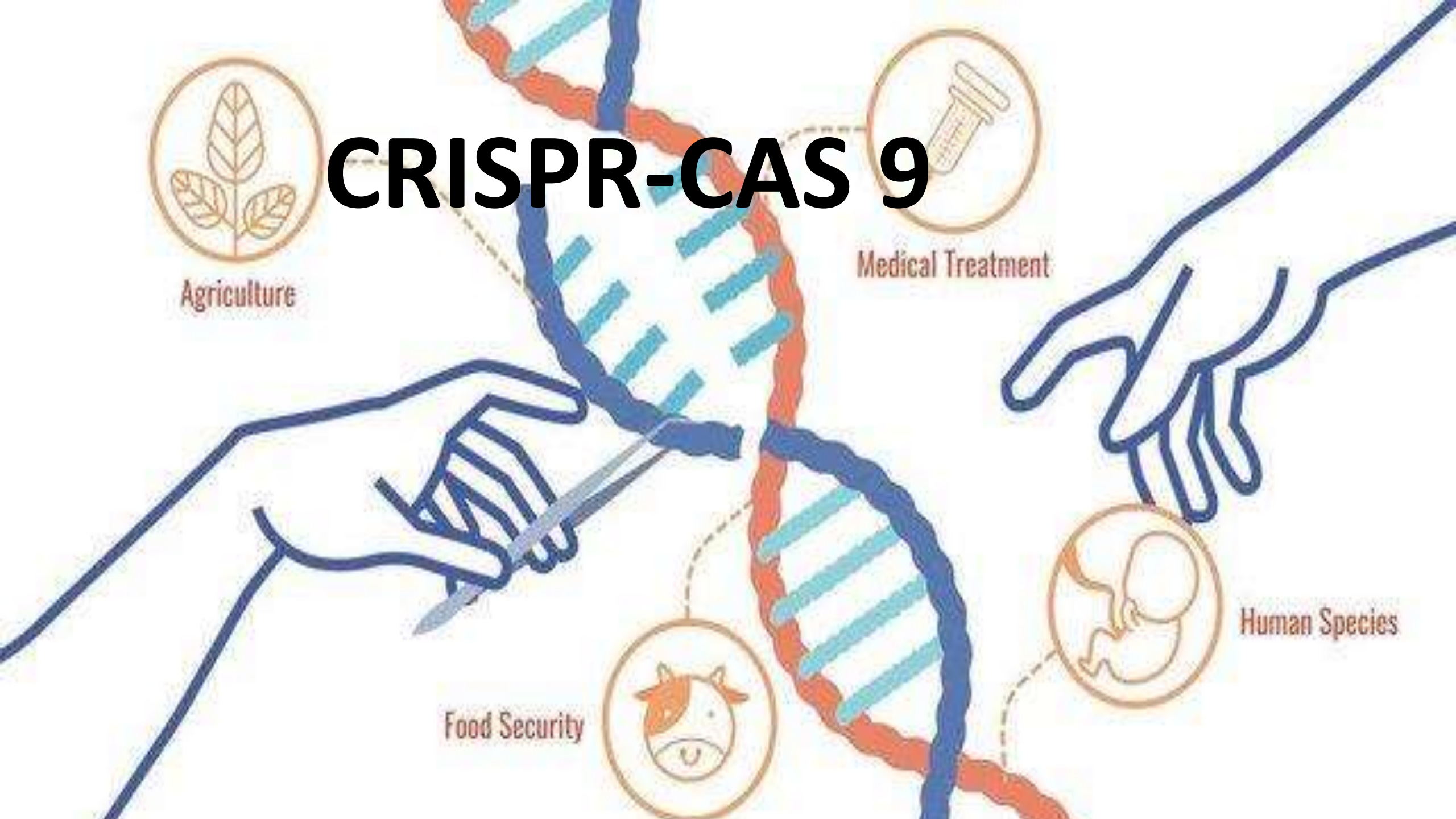
Medical Treatment

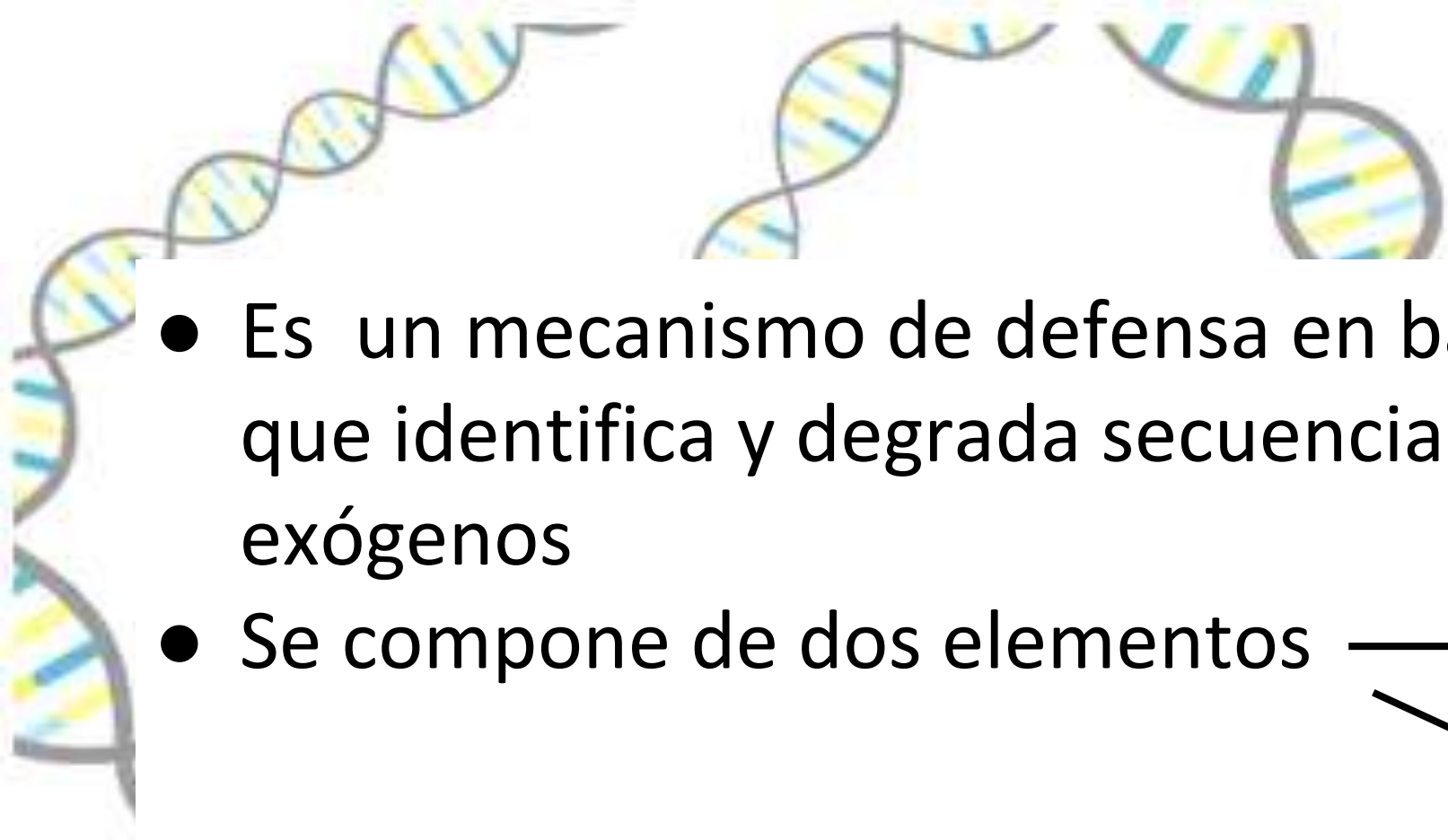

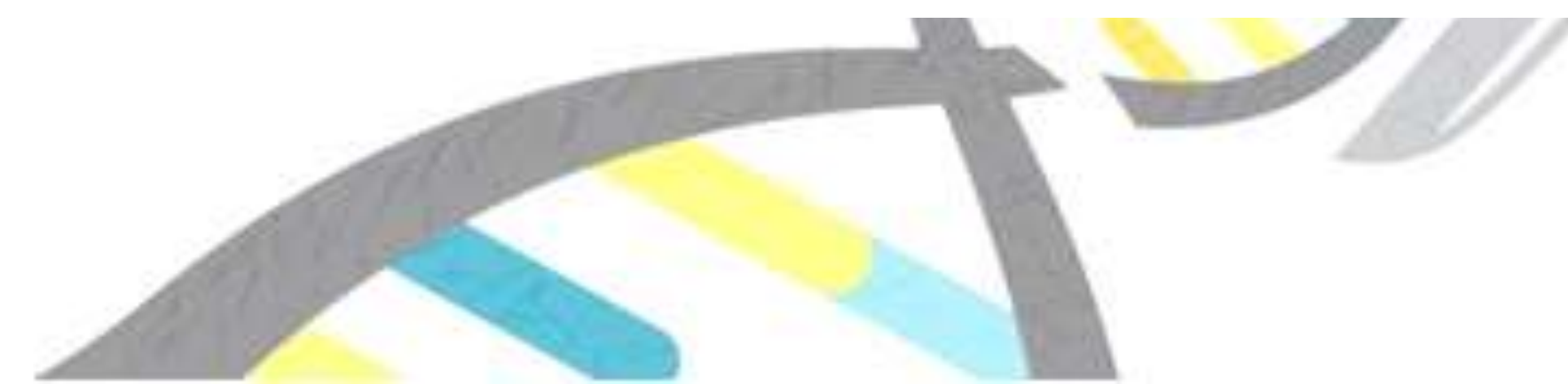


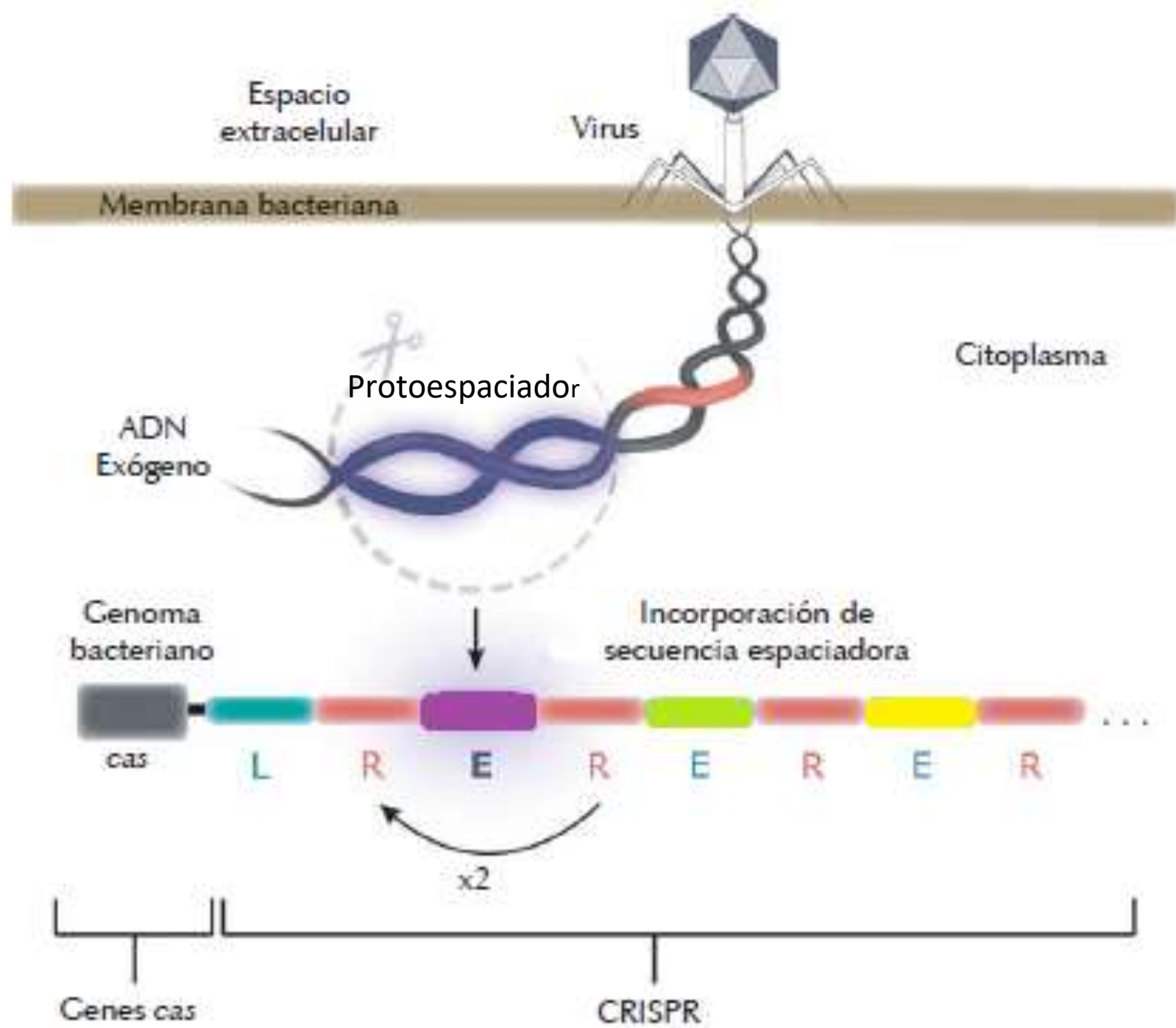
Human Species



Food Security



- 
- Es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas que identifica y degrada secuencia de ácidos nucleicos exógenos
  - Se compone de dos elementos 
    - ARNcr
    - endonucleasa Cas
- 





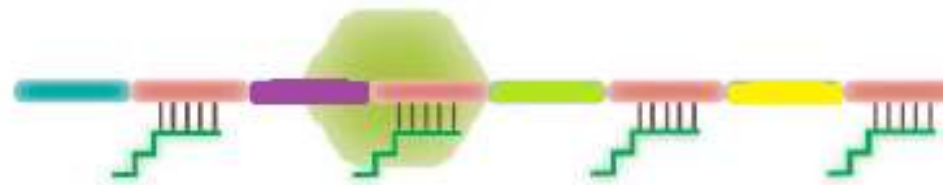
ADN doble cadena

Transcripción



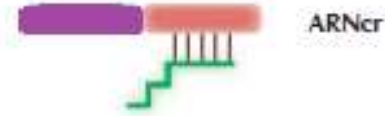
RNA mensajero  
Pre crRNA

Dímero reconocido  
por RNasa III



RNasa III

Procesamiento



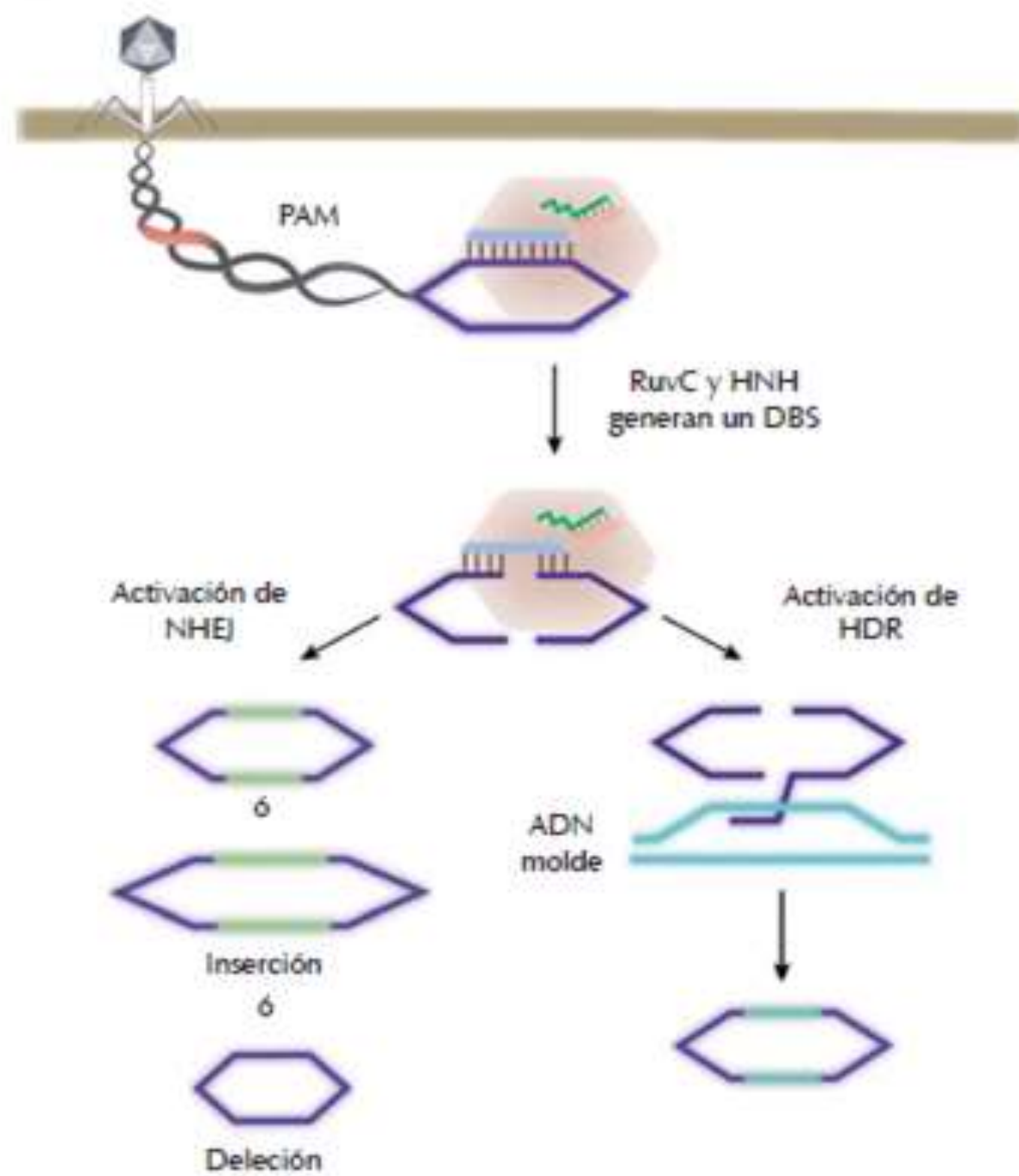
ARNcr

Formación de complejo  
CRISPR/Cas



Cas9





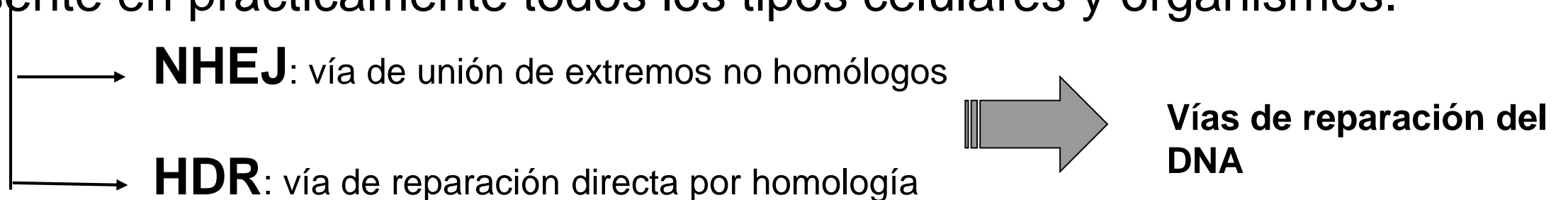


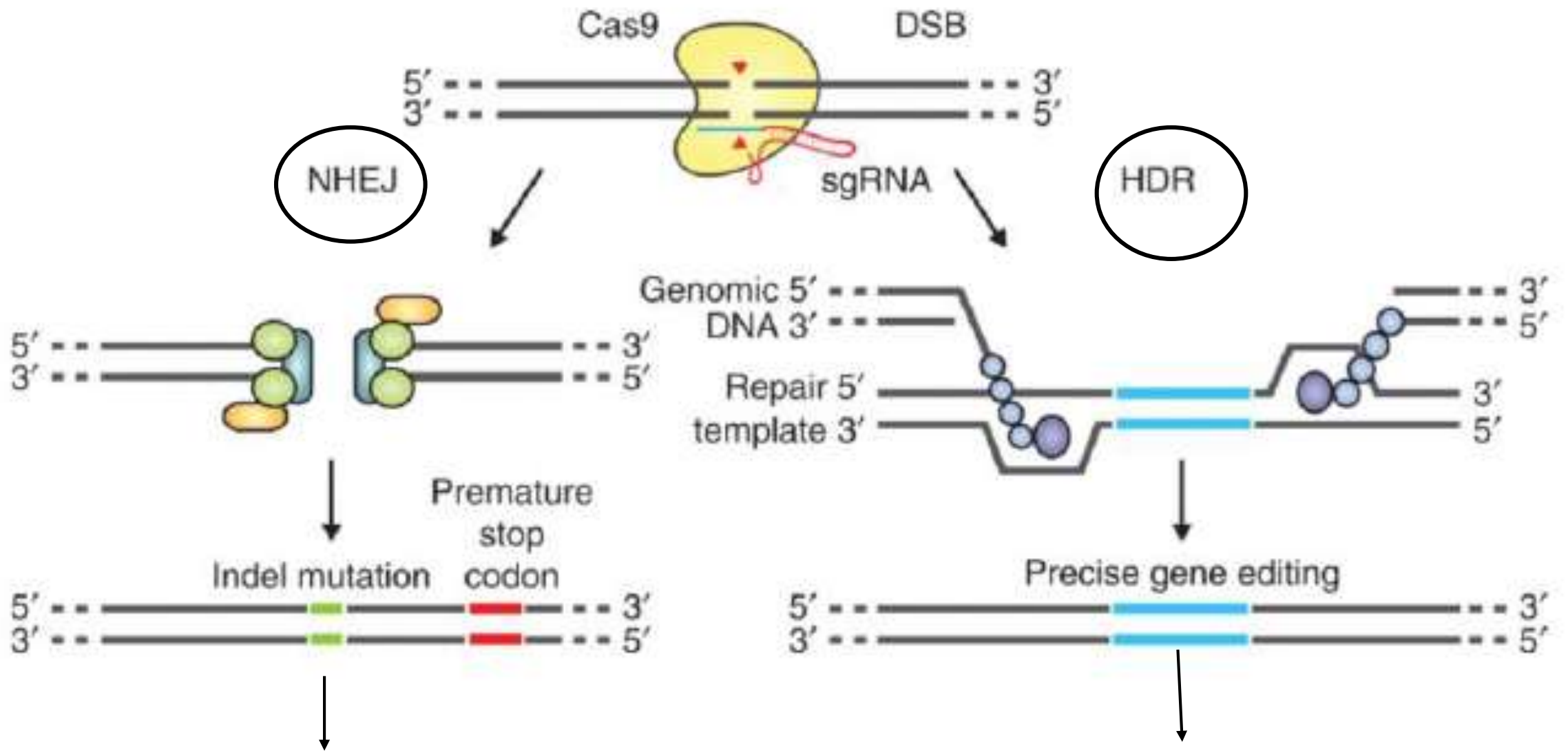
# Principios generales de ingeniería genómica mediante nucleasas de diseño:

Pasos esenciales:

1 generar un corte en ambas hebras del DNA para la cual se ha diseñado una nucleasa específica y un RNA guía

2- Se pone en marcha la maquinaria celular de reparación del ADN presente en prácticamente todos los tipos celulares y organismos.



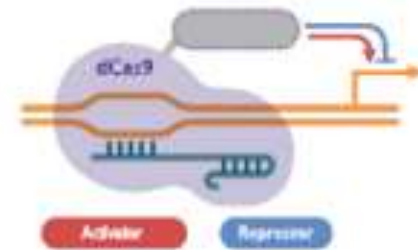


Knockouts

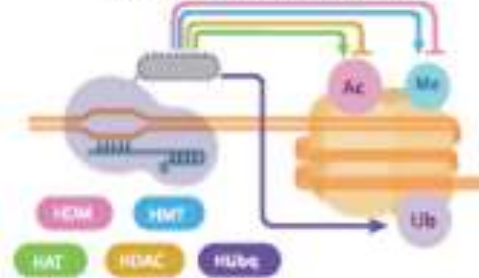
Puede dar lugar a una edición precisa y rigurosa en el lugar de corte.

# Aplicaciones de Crispr-cas9

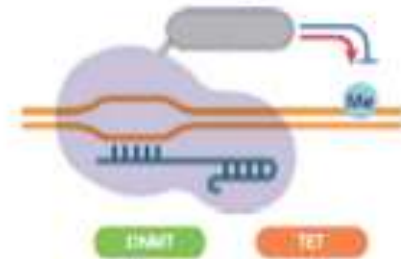
**A** Transcriptional Regulation



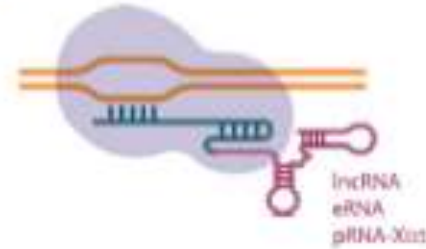
**B** Histone Residue Modification



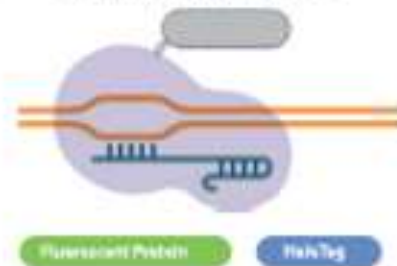
**C** DNA Methylation



**D** RNA Relocation

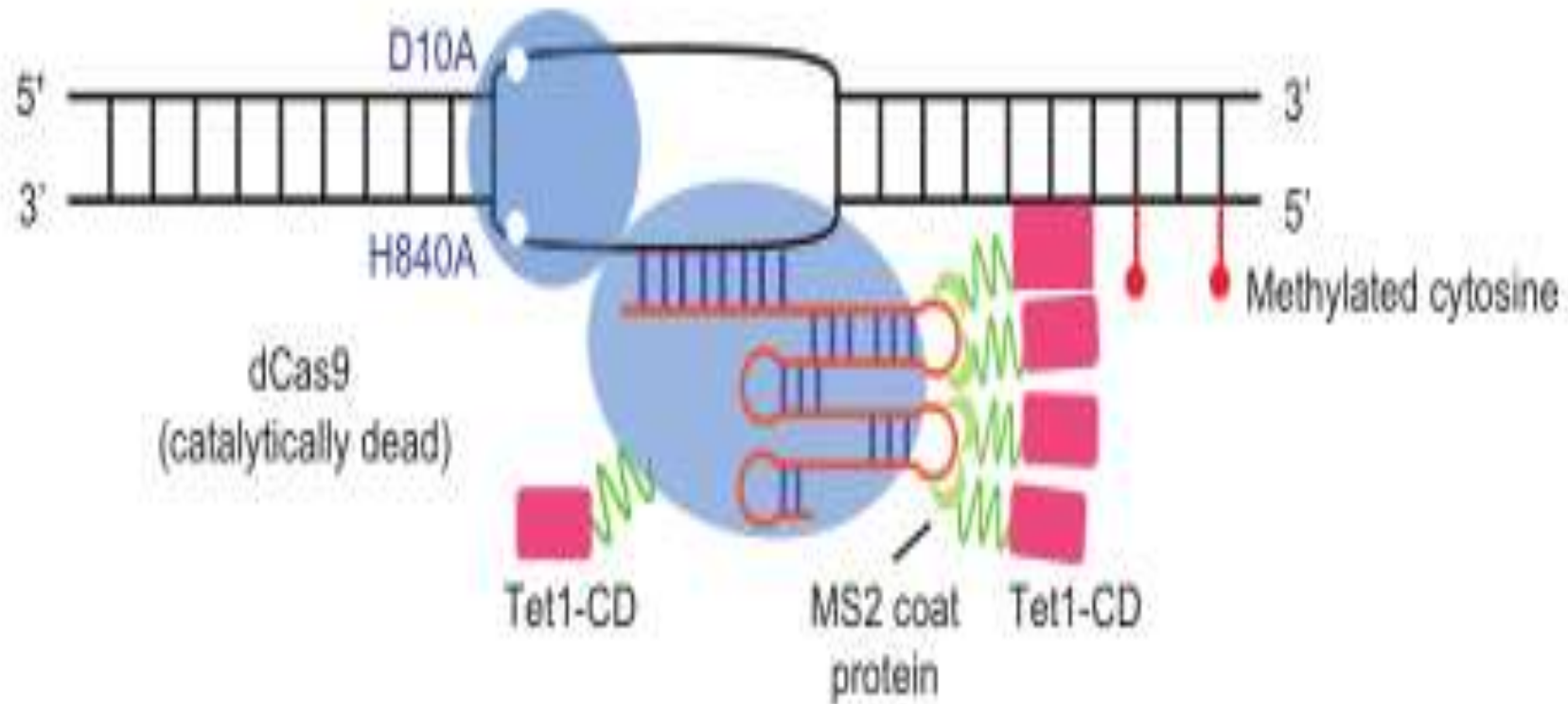


**E** Chromatin Visualization



# Uso de Crispr-cas9 en epigenética: Desmetilaciones

## Sistema de desmetilación dirigido dCas9/sgRNA2.0



✓ **¿Qué nos llevó a investigar sobre SPW?**

✓ **¿Se puede revertir la hipermetilación del gen que provoca el SPW?**

## - Hipótesis:

La hipermetilación del gen NDN del cromosoma 15 paterno que provoca el síndrome de Prader Willi se puede revertir mediante la aplicación de la técnica Crispr-Cas9.

## - Predicción:

- Esperamos un aumento en la expresión de NDN.
- A su vez esperamos revertir el fenotipo celular del SPW.

# Diseño experimental



**Trabajaremos con células neuronales que pediremos a Lisa Burnett; posteriormente aplicaremos los experimentos propuestos.**

2010

## Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader–Willi syndromes

Stormy J. Chamberlain<sup>a,b,2</sup>, Pin-Fang Chen<sup>b</sup>, Khong Y. Ng<sup>b</sup>, Fany Bourgois-Rocha<sup>b,1</sup>, Fouad Lemtiri-Chlieh<sup>c</sup>, Eric S. Levine<sup>c</sup>, and Marc Lalande<sup>a,b,2</sup>

2016

Induced pluripotent stem cells (iPSC) created from skin fibroblasts of patients with Prader-Willi syndrome (PWS) retain the molecular signature of PWS

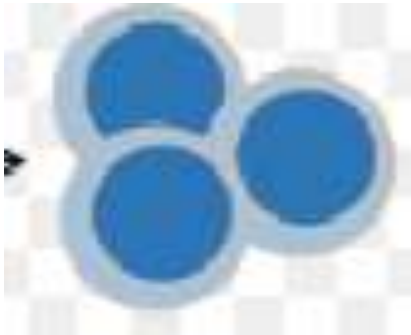


Lisa C. Burnett<sup>a,b,c</sup>, Charles A. LeDuc<sup>b,c,d</sup>, Carlos R. Sulsona<sup>e</sup>, Daniel Paull<sup>f</sup>, Sanaa Eddiry<sup>g</sup>, Brynn Levy<sup>h</sup>, Jean Pierre Salles<sup>g,i</sup>, Maïthe Tauber<sup>g,i,j</sup>, Daniel J. Driscoll<sup>e</sup>, Dieter Egli<sup>b,c,f</sup>, Rudolph L. Leibel<sup>b,c,d,\*</sup>

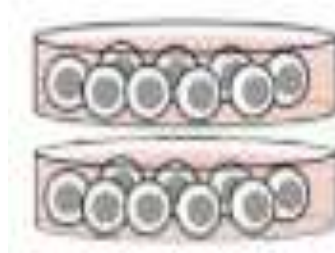


# Cultivo celular y transfección

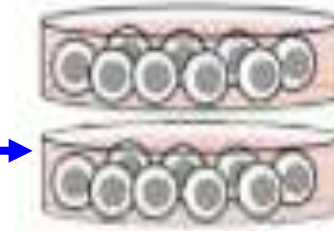
CÉLULAS NEURONALES



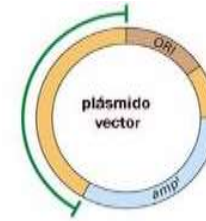
CULTIVO EN MEDIO



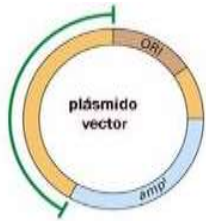
TRANSFECCIÓN



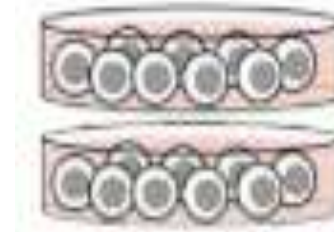
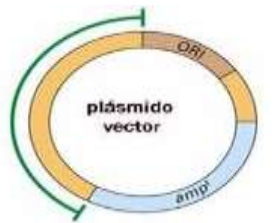
VECTOR VACIO



VECTOR dCas-Tet1-CD



VECTOR MS2-Tet1-CD

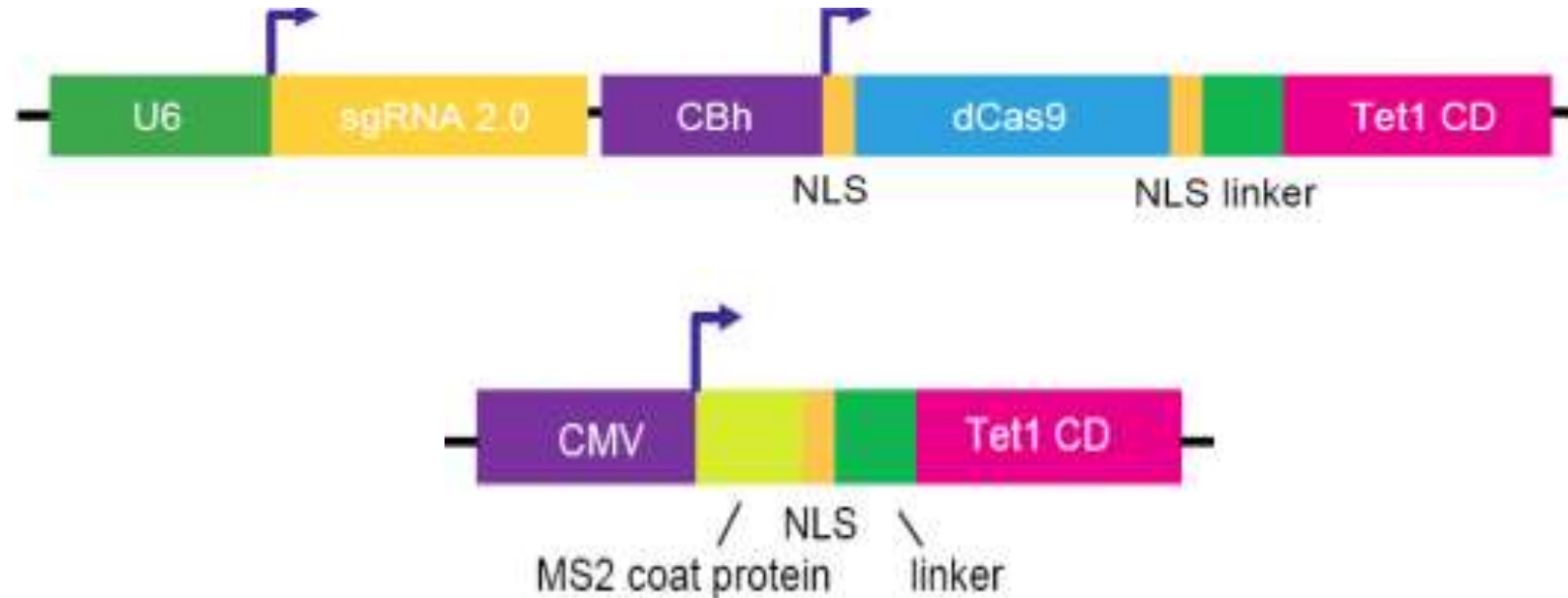


# Aplicaciones:

- **Crispr-cas9**

## Construcción de plásmidos

Trabajaremos con el plásmido pcDNA3EGFP + cassettes génicos



**Secuenciación por bilsulfito**



**Mapeo de metilaciones  
del promotor del gen  
NDN**

**PCR en tiempo real**



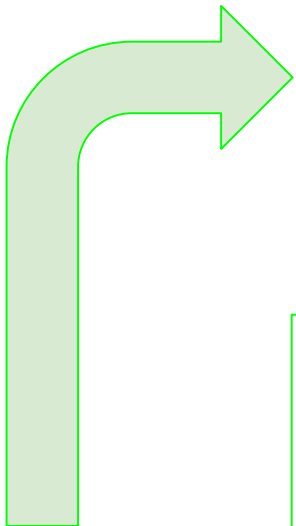
**Cuantificar la cantidad de  
mRNA**

**Western blot**



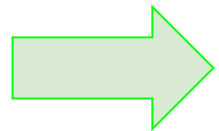
**Detectar la proteína  
NECDIN**

**Cultivo iPSC-dif neural**

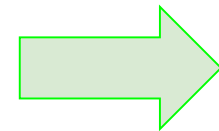


**Control de hipermetilación**

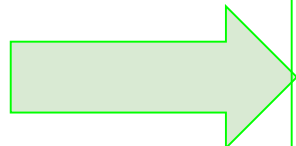
iPSC-dif neural con PW sin CRISPR



Extracción y aislamiento de DNA, mRNA y proteínas

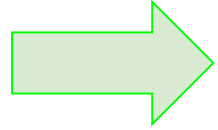


Cuantificación en RT-PCR + Western blot + BSS

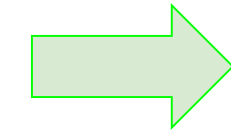


**Experimental 1**

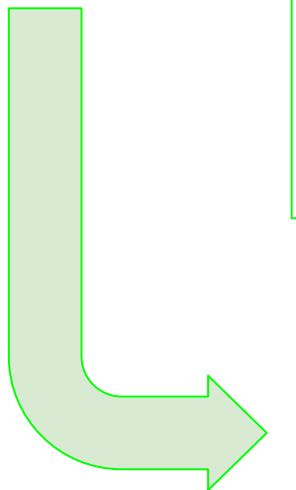
iPSC-dif neural con PW dCas-9-Tet1-CD + MS2-Tet1-CD,



Extracción y aislamiento de DNA, mRNA y proteínas

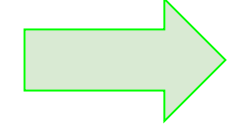


Cuantificación en RT-PCR + Western blot + BSS

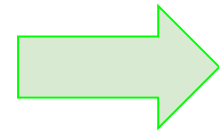


**Experimental 2**

iPSC-dif neural con PW dCas-9-Tet1-CD + MS2-Tet1-CD, (Mayor concentración)



Extracción y aislamiento de DNA, mRNA y proteínas

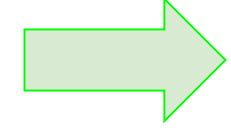


Cuantificación en RT-PCR + Western blot + BSS

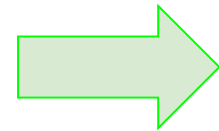


**Control CRISPR**

iPSC-dif neural sin PW transfectada con un vector vacío



Extracción y aislamiento de DNA, mRNA y proteínas



Cuantificación en RT-PCR + Western blot + BSS

**Cultivo de iPSC-dif neural**

## Control negativo

iPSC-dif neural con PW  
sin CRISPR

## Experimental 1

iPSC-dif neural con PW  
D-Cas-9-Tet1-CD + MS2-TM

## Experimental 2

iPSC- dif neural con PW  
D-Cas-9-TM + MS2-Tet1-CD

## Experimental 3

iPSC-dif neural con PW  
D-Cas-9-TM + MS2-TM

## Control positivo

iPSC-dif neural sin PW

Extracción y  
aislación de  
DNA, mRNA  
y proteínas

Extracción y  
aislación de  
DNA, mRNA  
y proteínas

Extracción y  
aislación de  
DNA, mRNA  
y proteínas

Cuantificación  
en RT-PCR +  
Western blot +  
BSS

Cuantificación  
en RT-PCR +  
Western blot  
+ BSS

Cuantificación  
en RT-PCR +  
Western blot +  
BSS

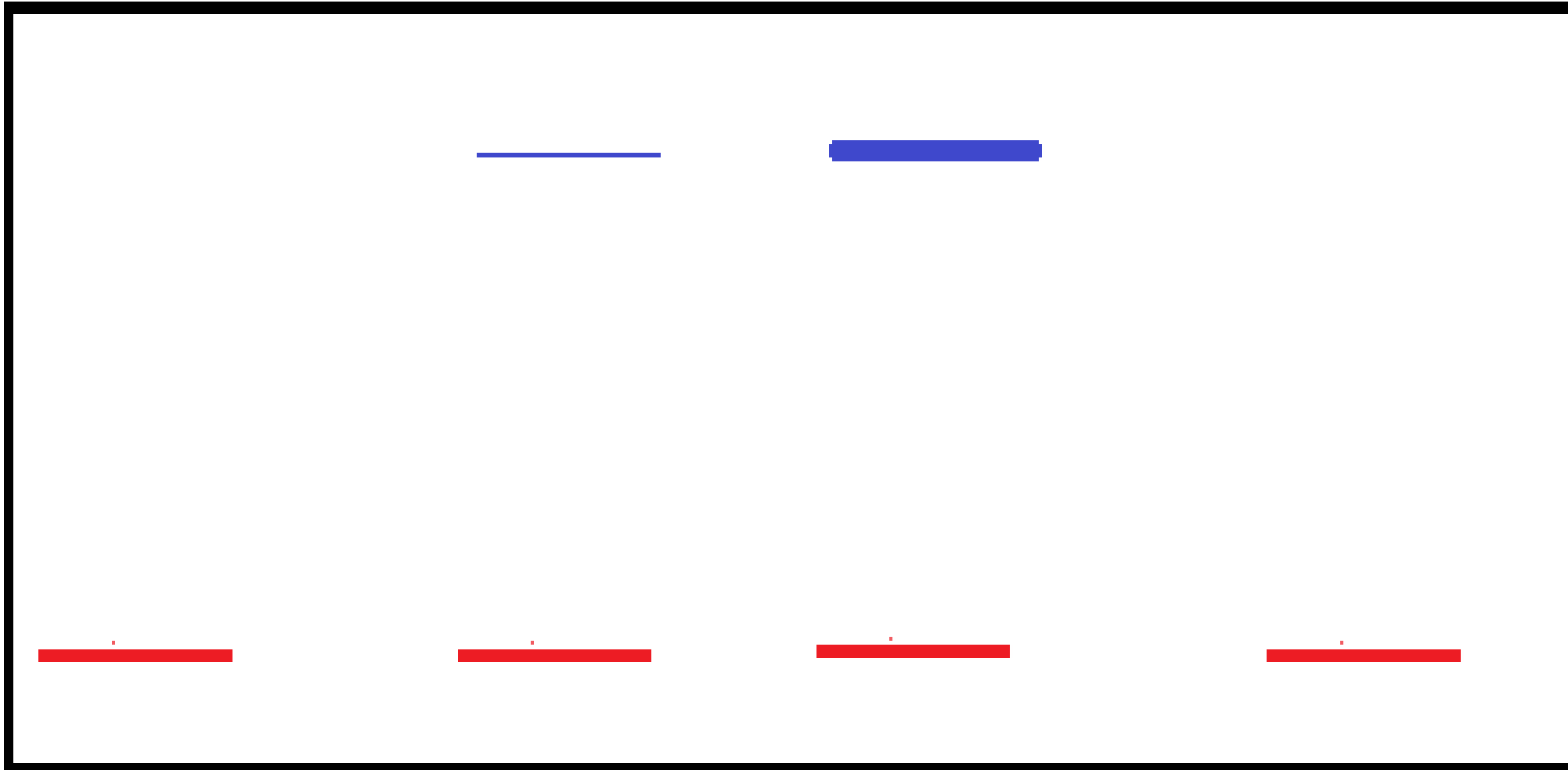
**Resultados esperados**

**Control de  
hipermetilación**

**Experimental 1**

**Experimental 2**

**Control de  
CRISPR**



**proteína Necdin**

**beta-actina**

Silvia Pagliardini et al; 2005.

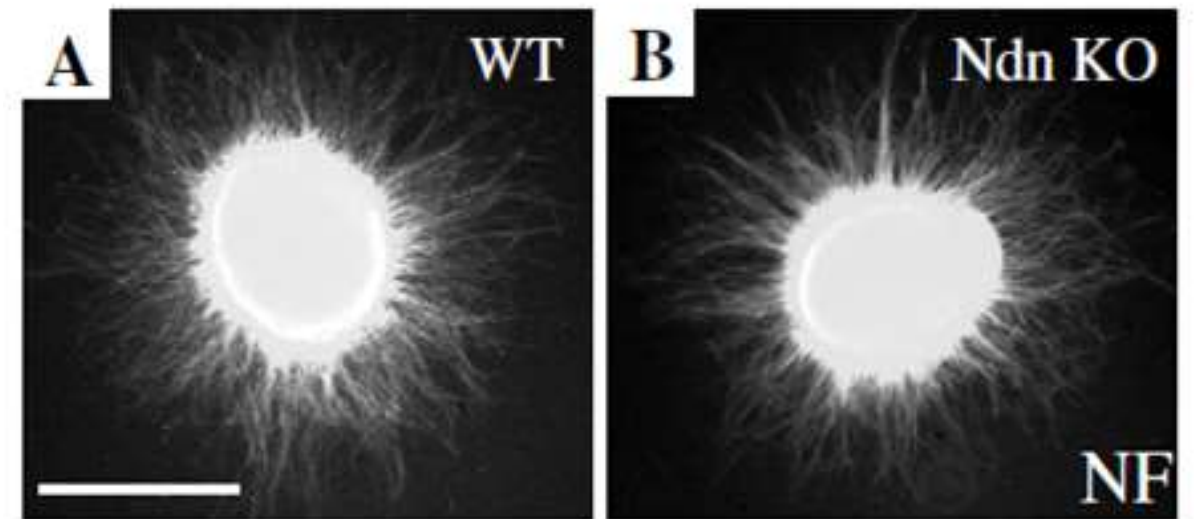
## Developmental Abnormalities of Neuronal Structure and Function in Prenatal Mice Lacking the Prader-Willi Syndrome Gene Necdin

Research article

Open Access

**Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death**

David Andrieu<sup>1</sup>, Hamid Meziane<sup>2</sup>, Fabienne Marly<sup>1</sup>, Corinne Angelats<sup>1</sup>, Pierre-Alain Fernandez<sup>1</sup> and Françoise Muscatelli<sup>\*1</sup>





# **Importancia del trabajo**

- Mayor entendimiento de la forma por la cual la metilación del ADN regula la expresión de genes en contextos específicos.
- Uso a futuro de este sistema para manipular la metilación del ADN de manera específica.
- Posibilidad de utilización de esta técnica para el manejo y estudio en nuevas líneas celulares.
- Importancia clínica.

**¿Nuestro proyecto podría aplicarse  
posteriormente en embriones  
humanos?**

# Técnicas de manipulación en animales

```
graph TD; A[Técnicas de manipulación en animales] --> B[Partición o separación de células embrionarias]; A --> C[Crioconservación o congelación de embriones]; A --> D[Utilización de embriones como material biológico de investigación];
```

Partición o separación de células embrionarias

Crioconservación o congelación de embriones

Utilización de embriones como material biológico de investigación

**En seres humanos**

```
graph TD; A[En seres humanos] --> B[Fecundación in vitro y transferencia embrionaria (FIVET)];
```

Fecundación in  
vitro y  
transferencia  
embrionaria  
(FIVET)

- Una vez detectada la hipermetilación de NDN el procedimiento debería realizarse en la **etapa inicial del desarrollo**.
- En FIVET tendría que realizarse antes de la transferencia al útero materno.

# Pero...

- Aún no hay consenso en la manipulación de células embrionarias.
- Poco a poco se va aceptando la idea y no estamos tan lejos de que se puedan aplicar técnicas en células embrionarias.

# Referencias

1. XingXing X., et al. (2016). *A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation*. Cell discovery(2)
2. [13] S.J. Chamberlain, P, et al. (2010), *Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader- Willi syndromes*
3. H. Okuno, et al. (2017) *Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome*



4. María Fernanda Lammoglia-Cobo, et al.(2016), La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas.

5. Lisa C. Burnett, et al. (2016), Induced pluripotent stem cells (iPSC) created from skin fibroblasts of patients with Prader-Willi syndrome (PWS) retain the molecular signature of PWS.