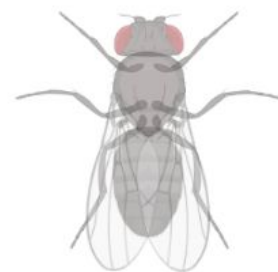
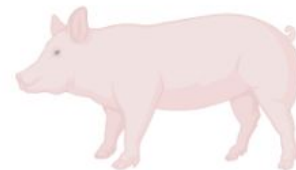
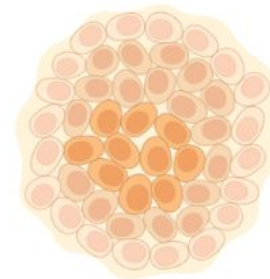


Abordajes para el estudio funcional de variantes genéticas noveles *in vitro* e *in vivo*

Jornadas de Genómica Clínica 2022


Julián Martínez Mayer
María Andrea Camilletti



Hipopituitarismo congénito (HC)

Prevalencia de 1/4000 – 1/10000 recién nacidos
Parks JS et al. Clin Perinatol. 2018 Mar;45(1):75-91

Severo

- 
- Holoprosencefalia
 - Displasia septo-óptica
 - Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (CPHD) ↓↓GH/PRL/TSH..
 - Hipogonadismo hipogonadotrófico
 - Insuficiencia aislada de hormona de crecimiento (IGHD) ↓↓GH

Moderado

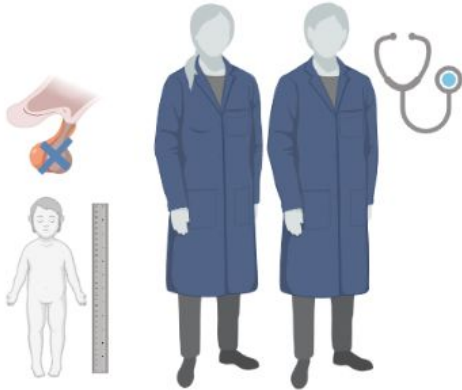
Heterogeneidad genética
Expresividad variable



Dificultan el diagnóstico

Severo
Leve

- Holoprosencefalia
- Displasia septo-óptica
- Deficiencia Combinada de Hormonas Hipofisarias
- Hipogonadismo Hipogonadotrófico
- Deficiencia Aislada de GH

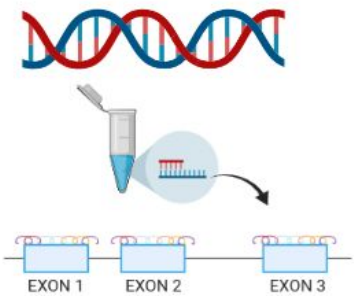


Selección de pacientes con HC

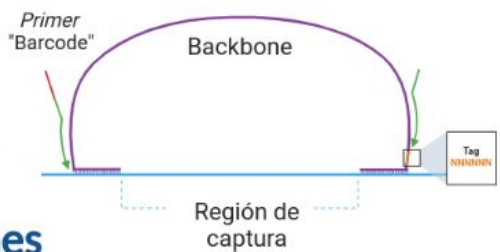
Fenotipo clínico



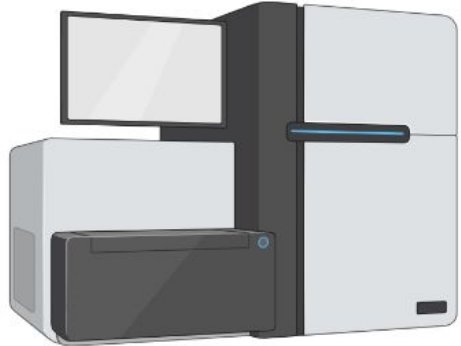
Extracción de ADN de sangre



Investigación básica en modelos *in vivo* e *in vitro*



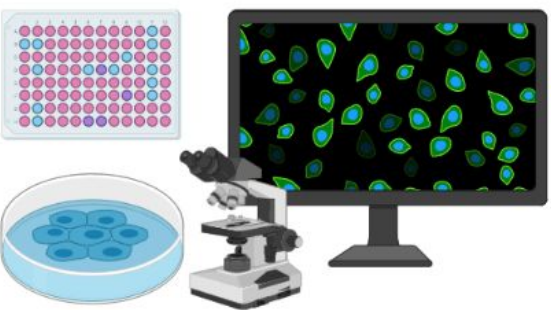
Panel de genes (MIPS) y WES/WGS



Secuenciación



Análisis Bioinformático

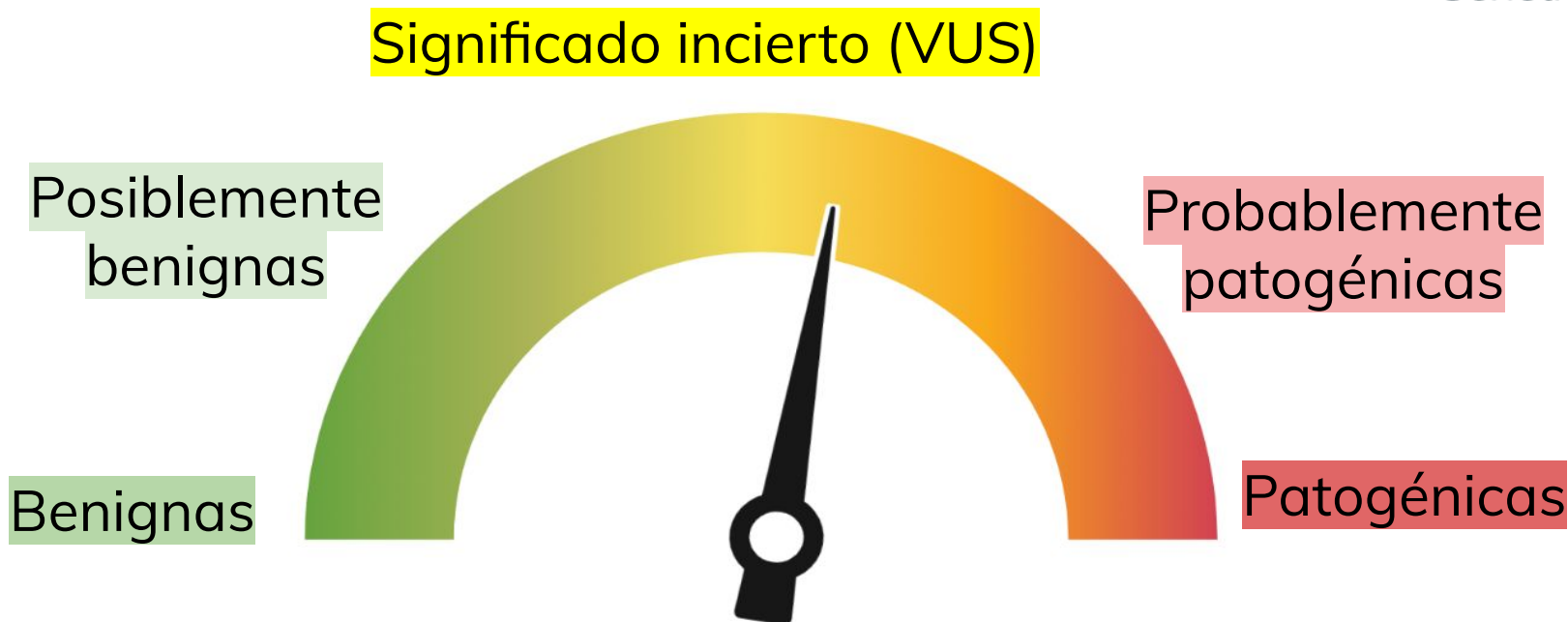


Ensayos funcionales



Ensayos funcionales: ¿Cuándo debemos testear variantes?

Clasificación según criterio ACMG



Ensayos funcionales: ¿Cuándo debemos testear variantes?

Significado incierto (VUS)

No hay suficiente información

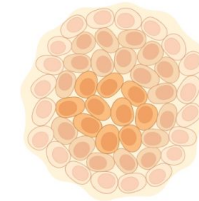
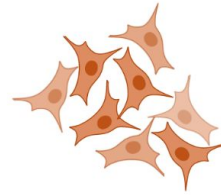
La información disponible es contradictoria

¿Es una variante reportada o novel?
¿Concuerda el fenotipo?
¿Está en un gen frecuente en la patología, o novedoso con pocos casos asociados?

Ensayos funcionales: Distintas estrategias

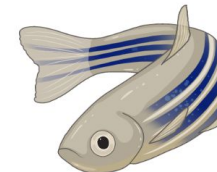
In vitro

- Ensayos de gen reportero Ej Luciferasa
- Ensayos de expresión proteica Ej Western blot, Inmunofluorescencia
- Células madre pluripotentes humanas inducidas (iPSCs)



In vivo

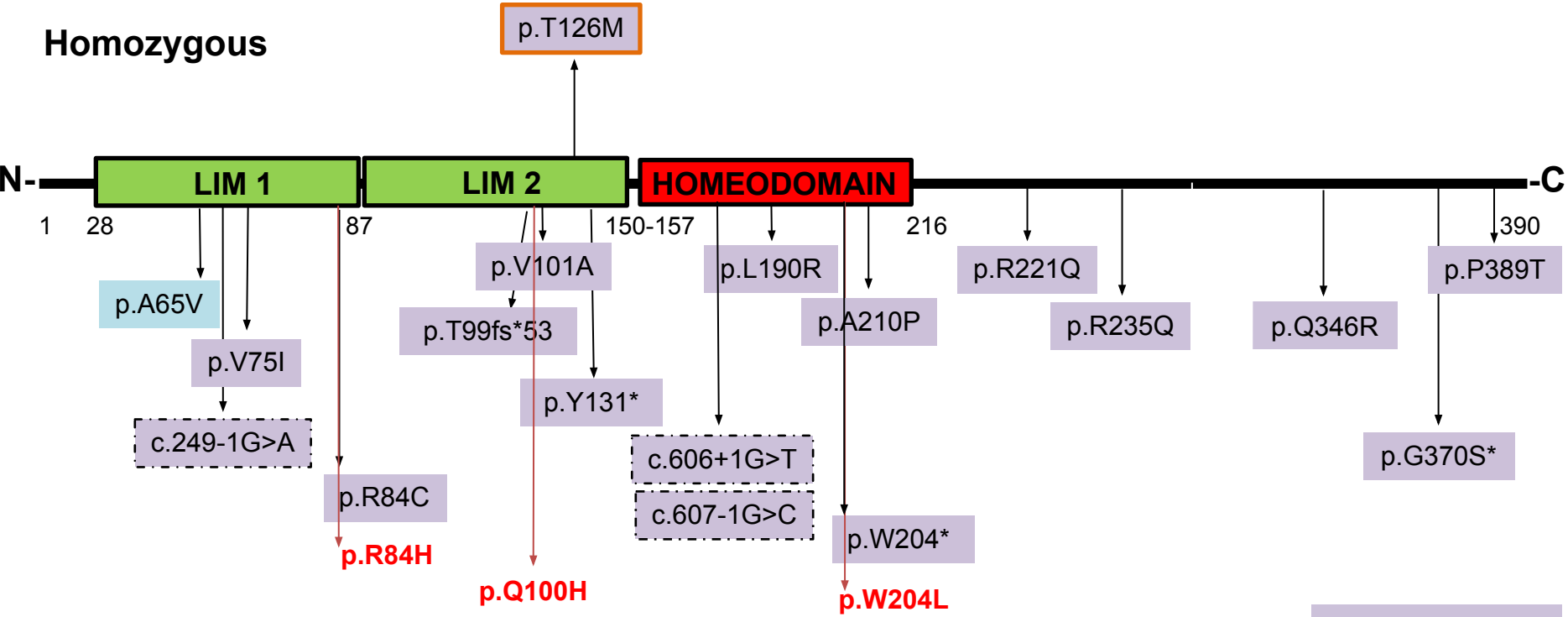
- Modelos animales (ratón, zebrafish)



Ensayos de gen reportero

Caso ejemplo: Variantes en LHX4

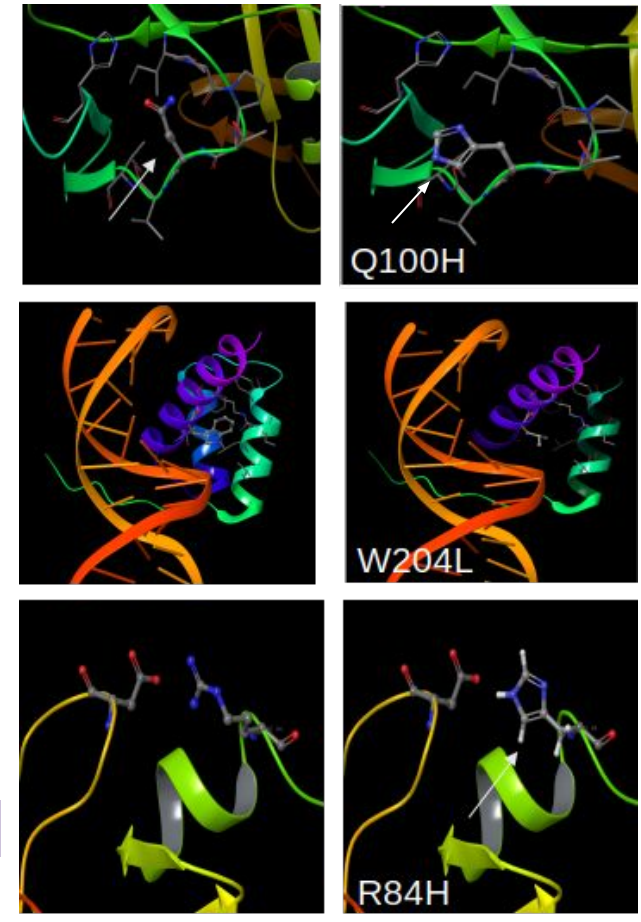
Homozygous



Dominant: Intron variant

Phenotypic spectrum: Lethal CPHD IGHD

522 kb w/ 3 genes
1.5 Mb w/ 12 genes
Gross deletion



Clínica asociada a las variantes halladas

Caso 1 R84H

♀, 7 años

Déficit de GH, TSH (CPHD)

Ulnar valgus

Caso 2 Q100H

♂, 2 años

Déficit de GH, TSH, ACTH (CPHD) y
SOD

Hipoplasia del quiasma

Caso 3 W204L

♂, 11 años

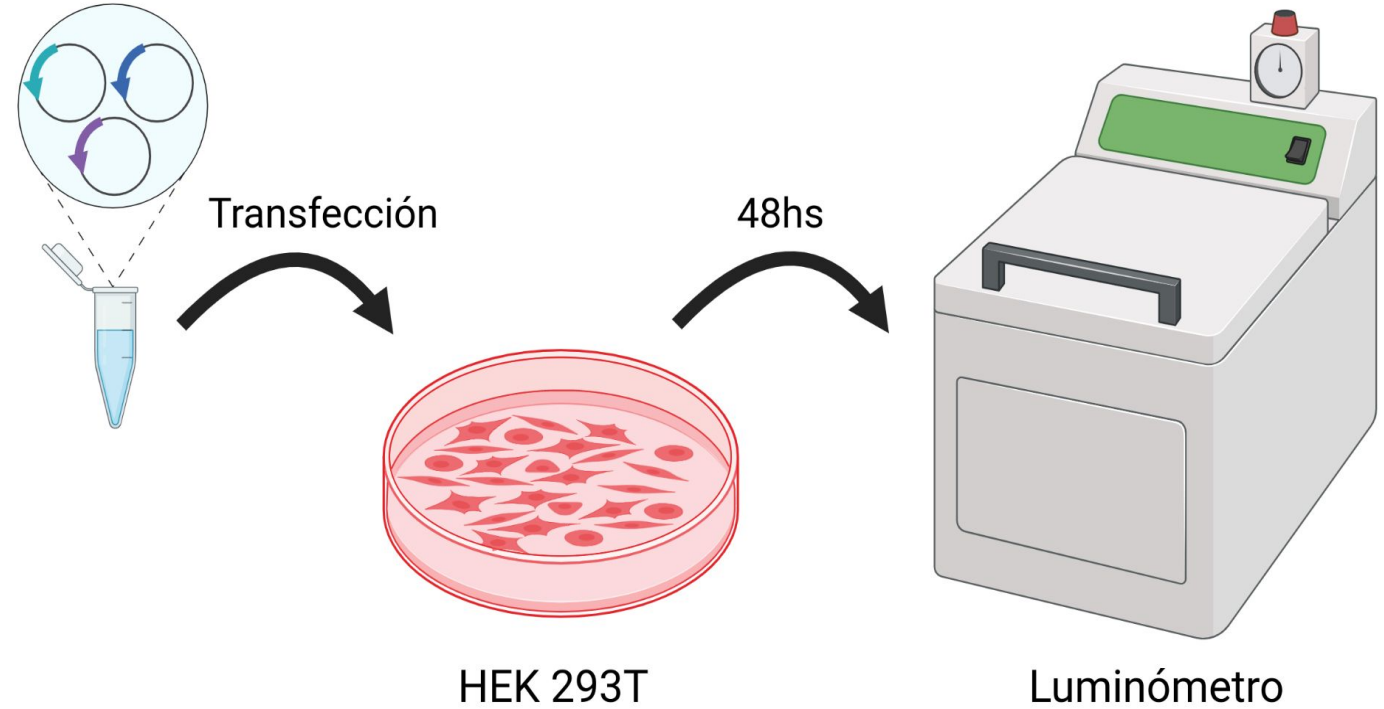
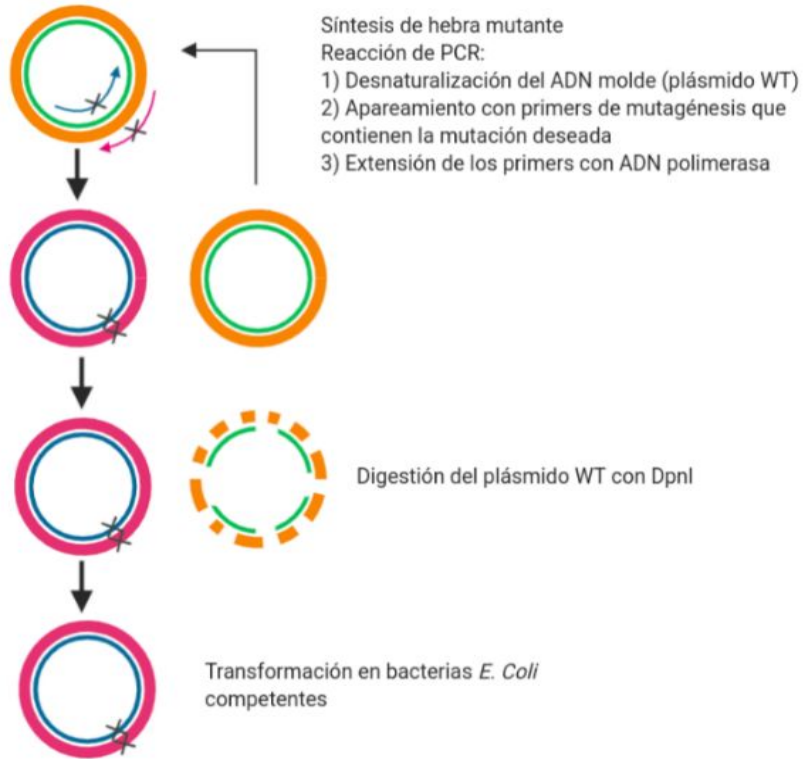
Déficit de GH, TSH, ACTH, PRL
(CPHD)

Hipogonadismo

Diseño experimental: ¿Cómo generamos las variantes?

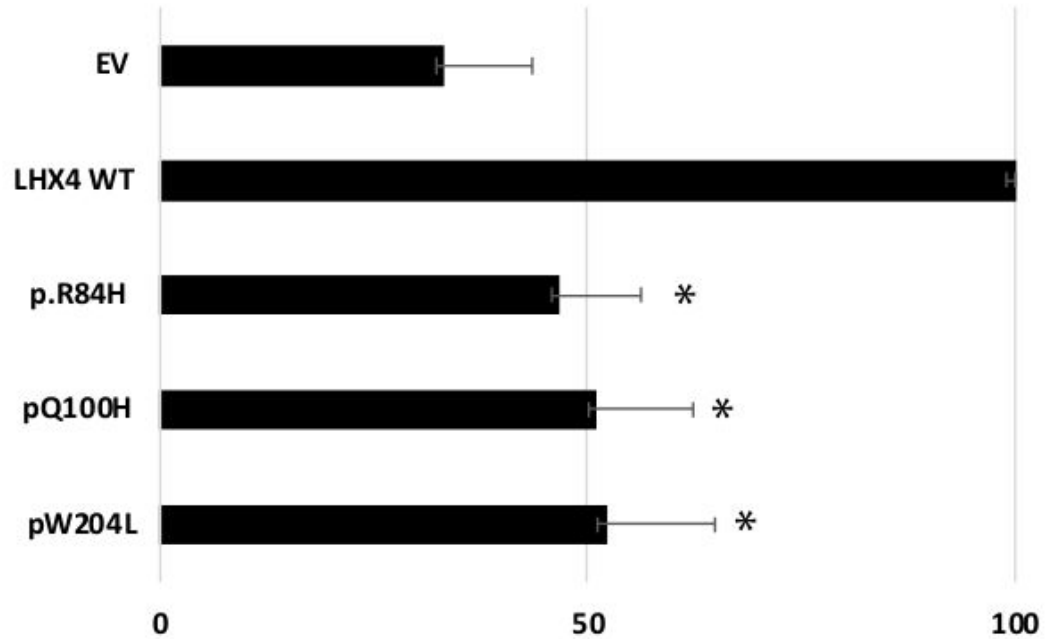
1 Mutagénesis sitio-dirigida

2 Transfección en células de mamífero

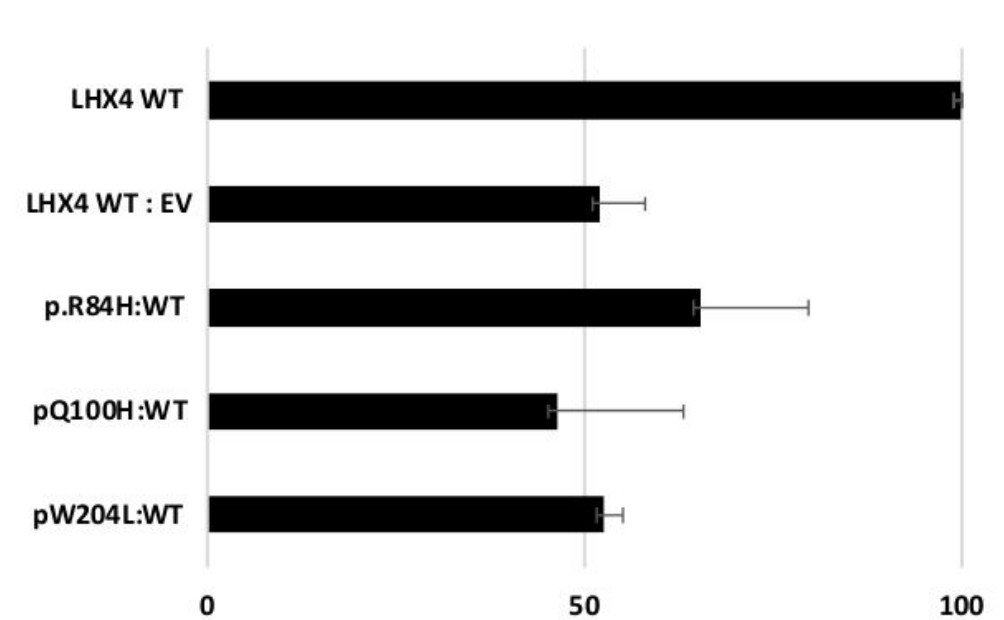


Ensayos de gen reportero

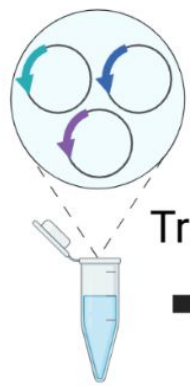
Relative luciferase activity (% of WT)



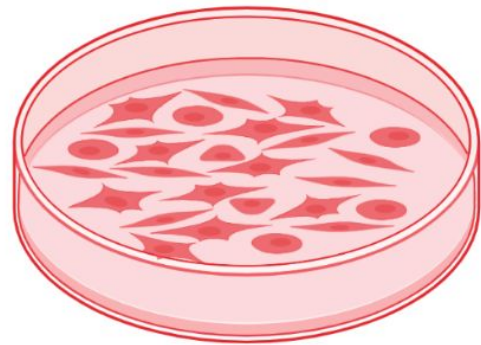
Relative luciferase activity (% of WT)



Ensayos de Expresión

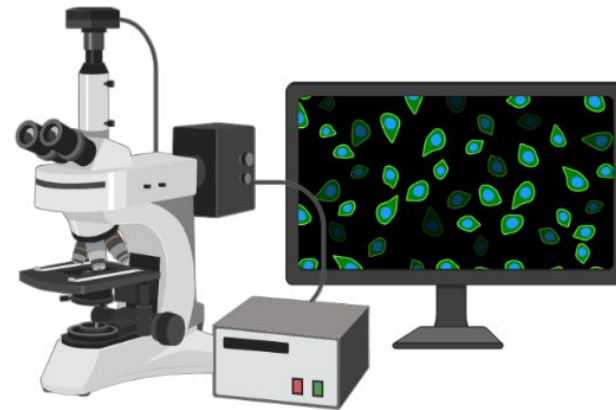


Transfección

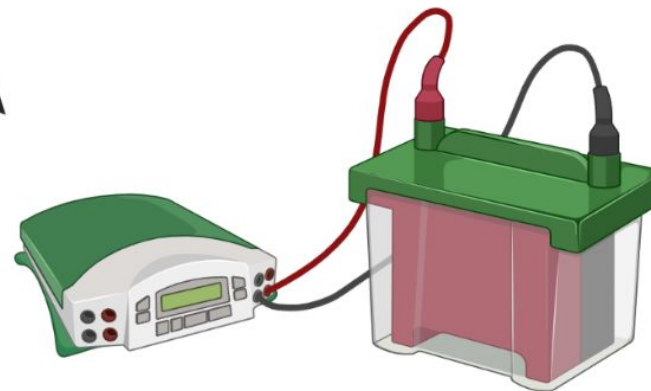


HEK 293T

24hs



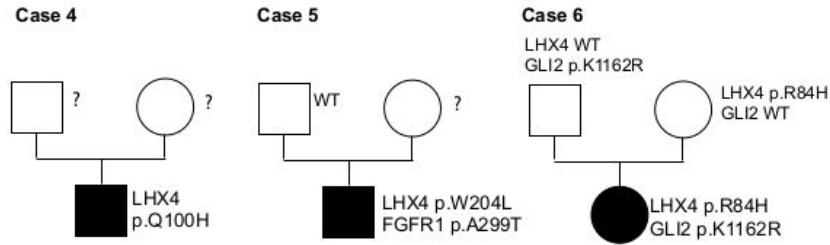
Inmunofluorescencia



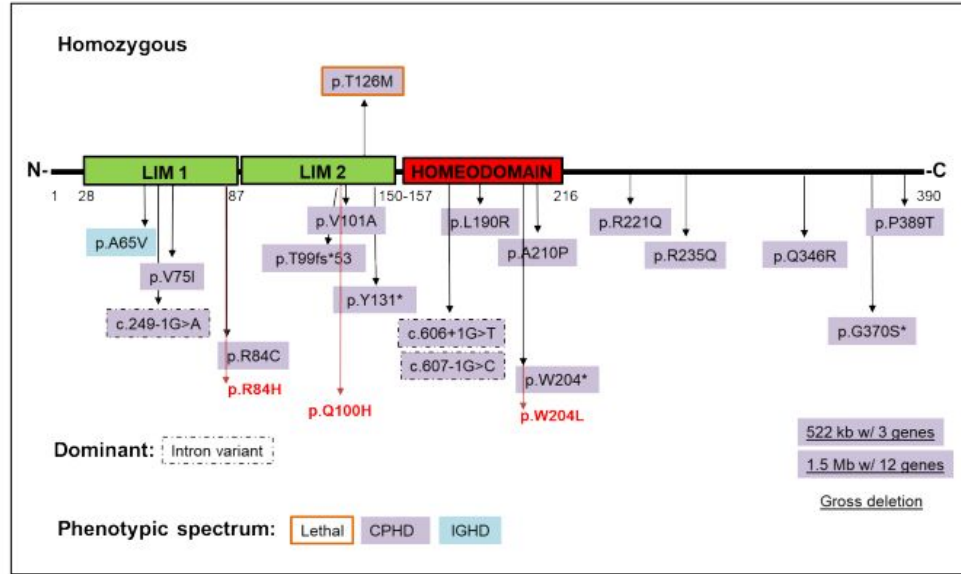
Western blot

Figure 3

A



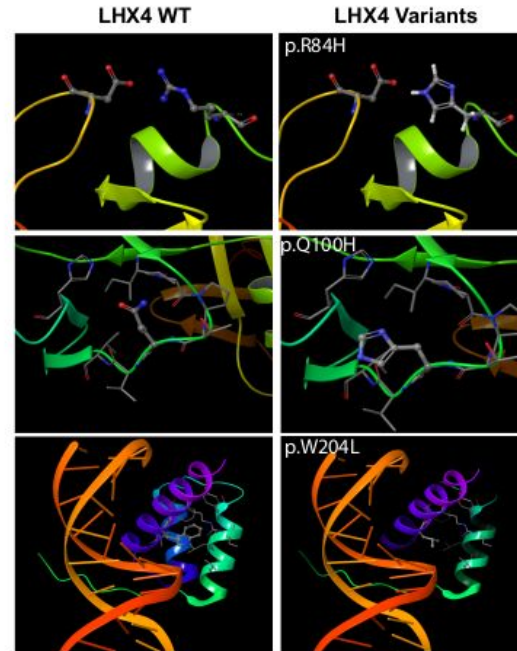
B



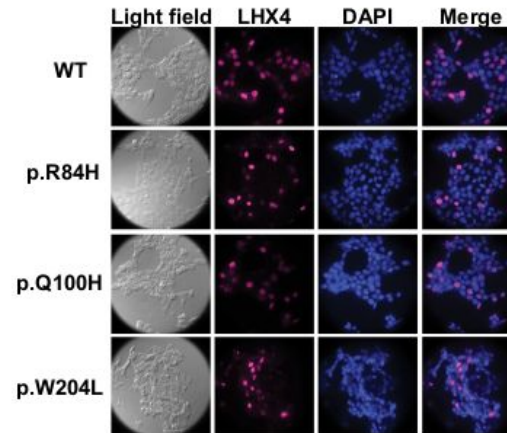
C

	p. R84H	p. Q100H	p. W204L
Human	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Chimpanzee	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Gorilla	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Mouse	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Cow	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Dog	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Elephant	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Dolphin	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Chicken	SVYCKEDFFK R FGTKCTACQQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		
Zebrafish	NVYCKEDFFK R FGTK A S C QQGIPPT Q VVRKAQDF-----TGLDMRVVQV W FQNRRAKE		

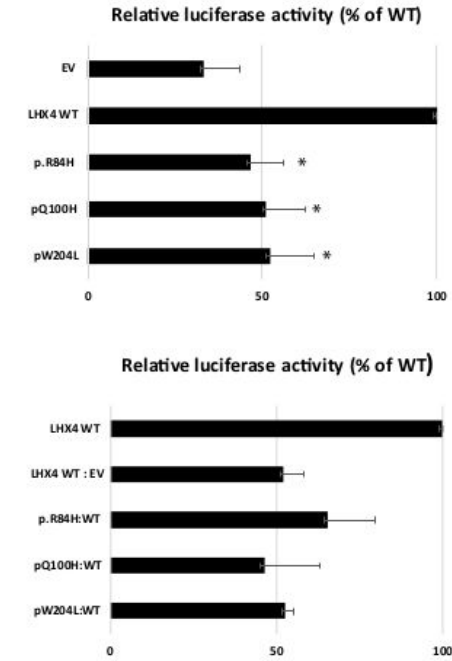
D



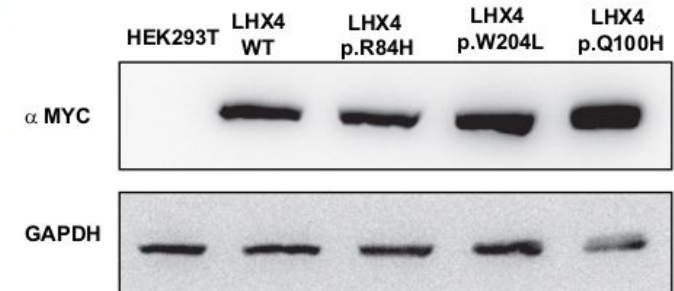
F



E



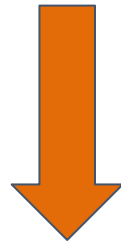
G



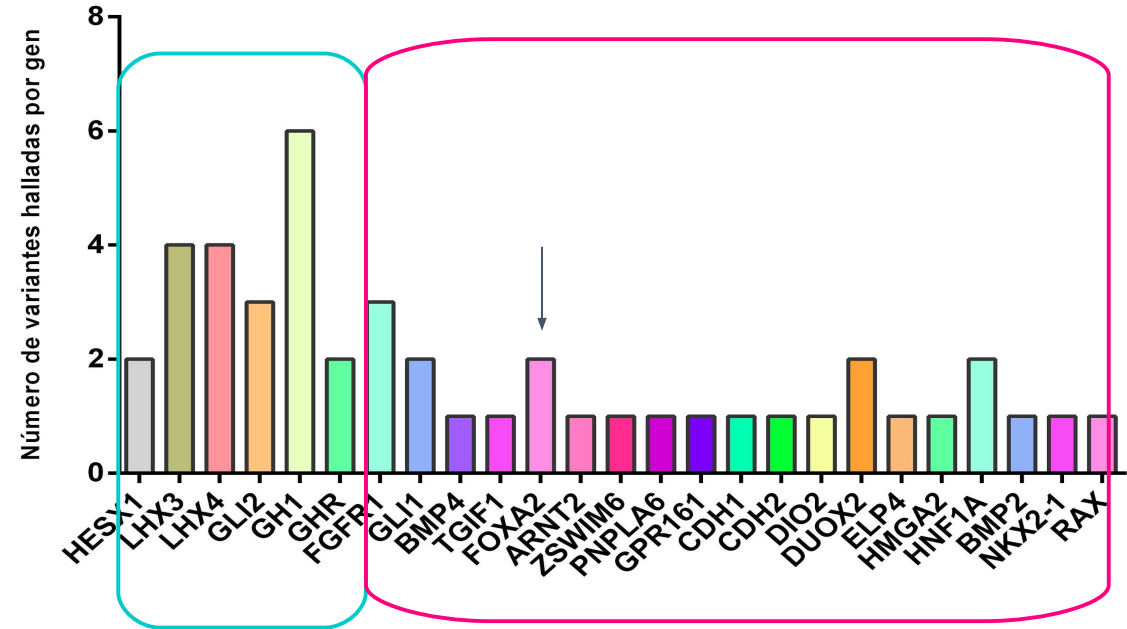
Variantes VUS o probablemente patogénicas en genes "novel" en la patología



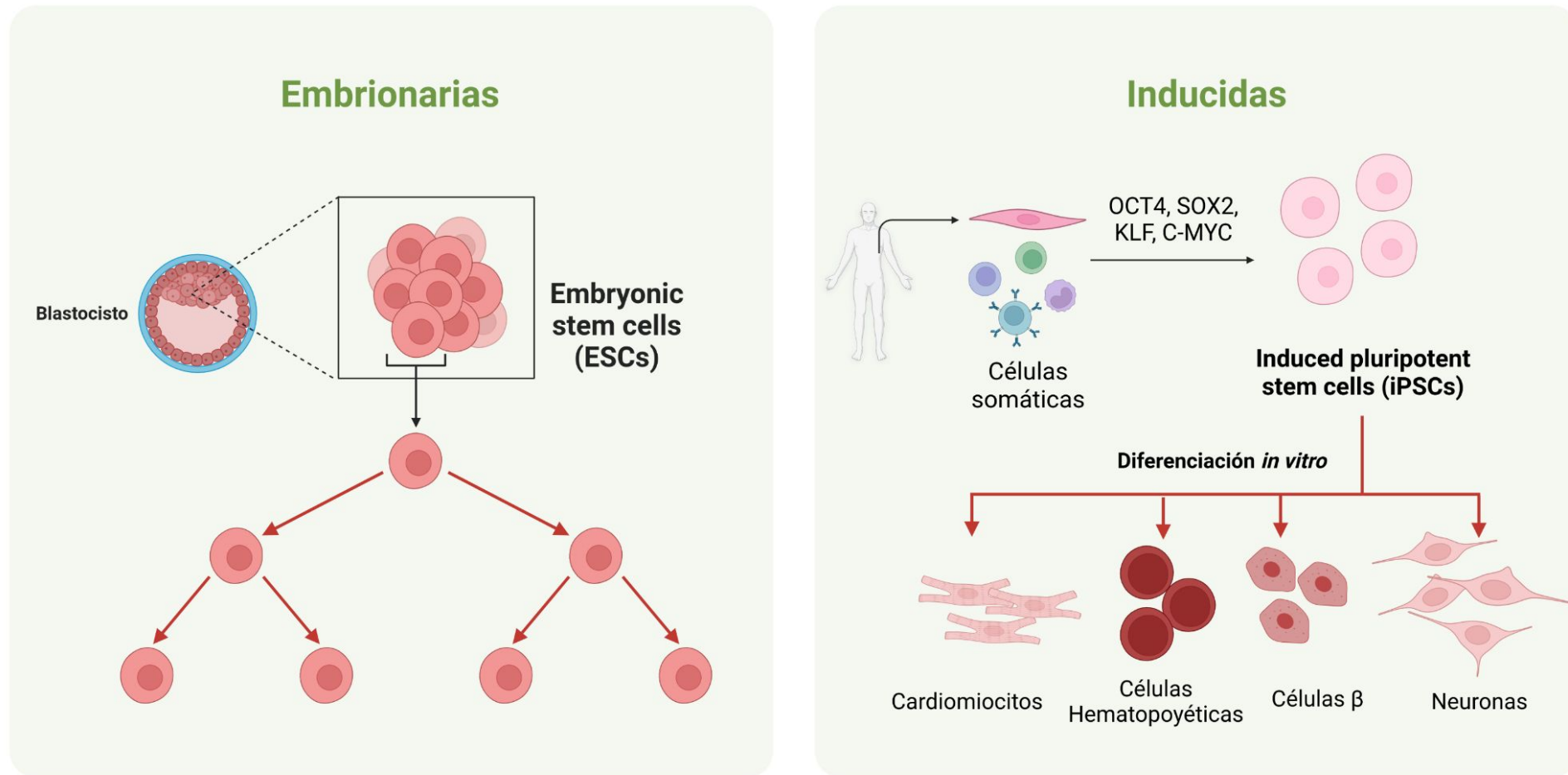
¿Qué abordaje experimental utilizamos para testear variantes de este tipo?



Ensayos basados en
Células madre pluripotentes inducidas
(iPSCs)

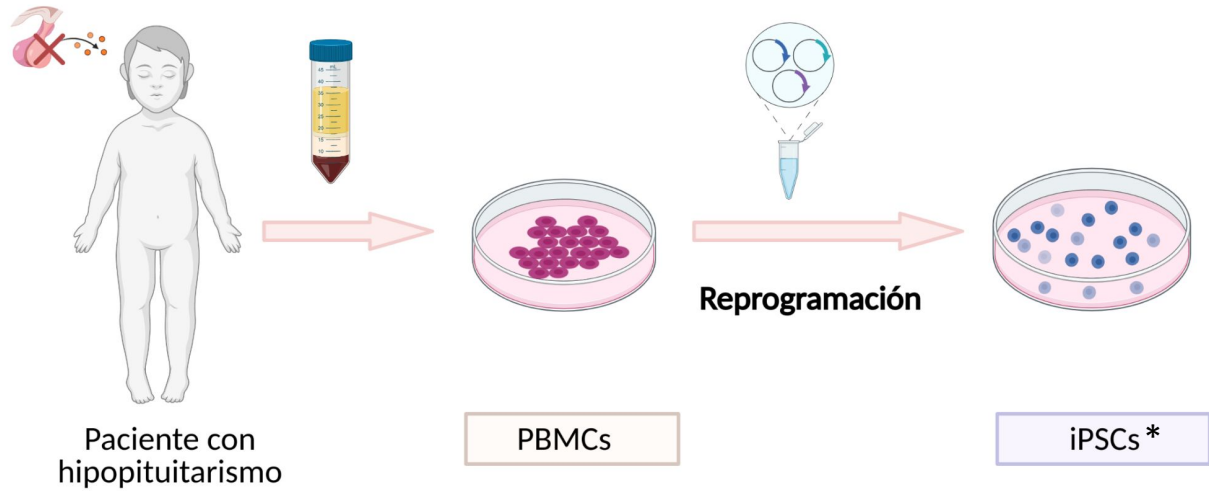


Células madre pluripotentes

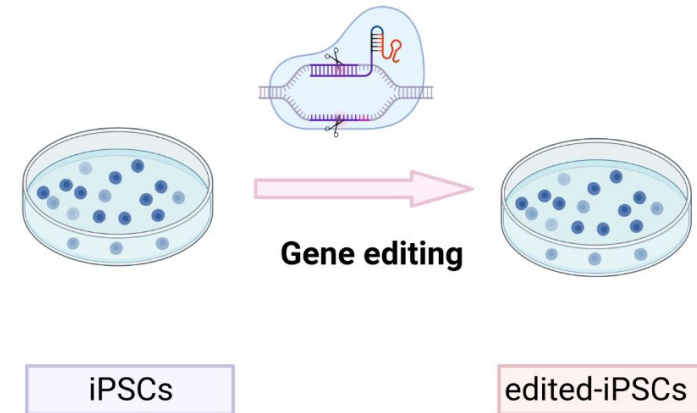


Células indiferenciadas con la capacidad única de autorrenovarse y diferenciarse hacia otros tipos celulares

Ensayos en iPSCs: Dos estrategias para modelar variantes genéticas de interés



Reprogramación celular de pacientes para obtener iPSCs que portan la mutación específica



Generar las mutaciones puntuales mediante el sistema CRISPR/CAS9

Doble ventaja:

Testeo funcional de variantes genéticas candidato

Estudio de genes noveles en un modelo de desarrollo embrionario humano



Caso ejemplo: Variante en FOXA2

FOXA2;p.S229*

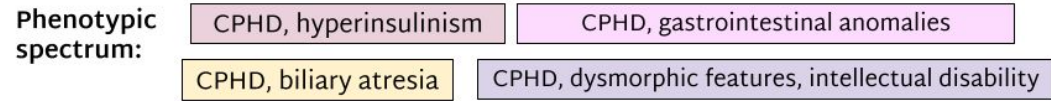
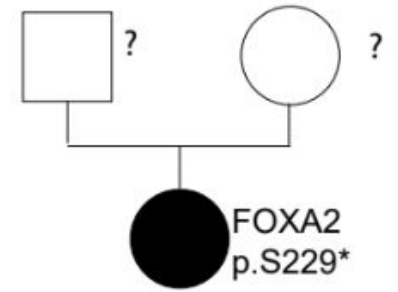
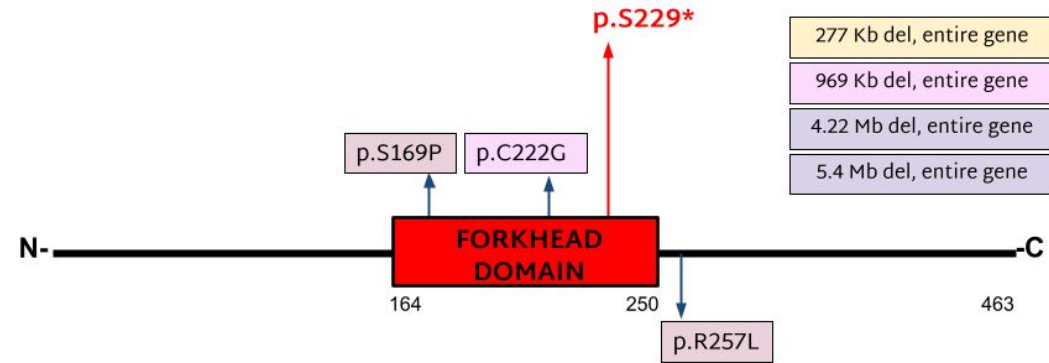
F, 13 años

Déficit de GH y TSH (CPHD)

MRI: Hipoplasia AP, tallo ausente, PP ortotópica. Espacios subaracnoideos aumentados

Anomalías craneofaciales

(nariz con puente nasal deprimido, macizo facial hipoplásico, facie peculiar, paladar ojival, telecanto)
hipoglucemia asintomática,
 mucocele al nacer.



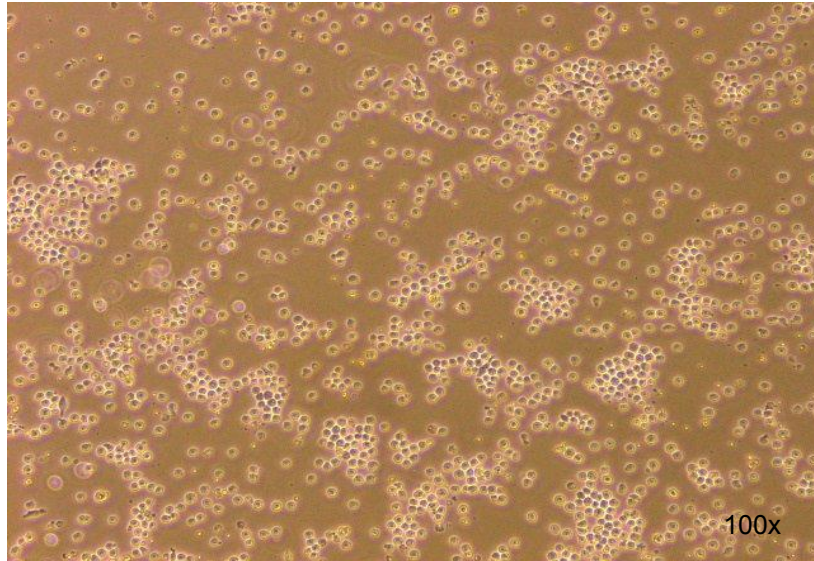
Human	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Chimpanzee	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Gorilla	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Mouse	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
GuineaPig	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Horse	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Cow	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Goat	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Dog	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Cat	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Elephant	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Chicken	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF
Zebrafish	SFND CFLKVP R SPDKPGKGSF

Ensayos en iPSCs

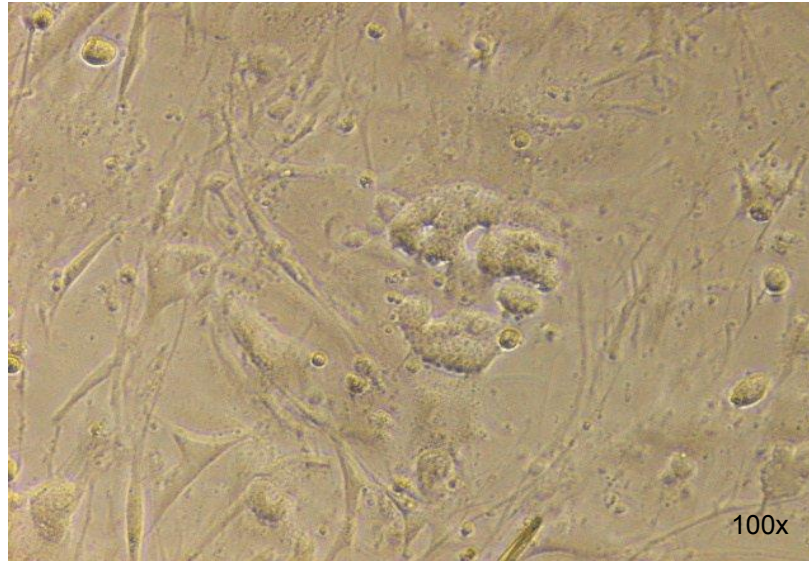
Prueba de concepto

Reprogramación celular de paciente portador de variante en FOXA2 p.S229*

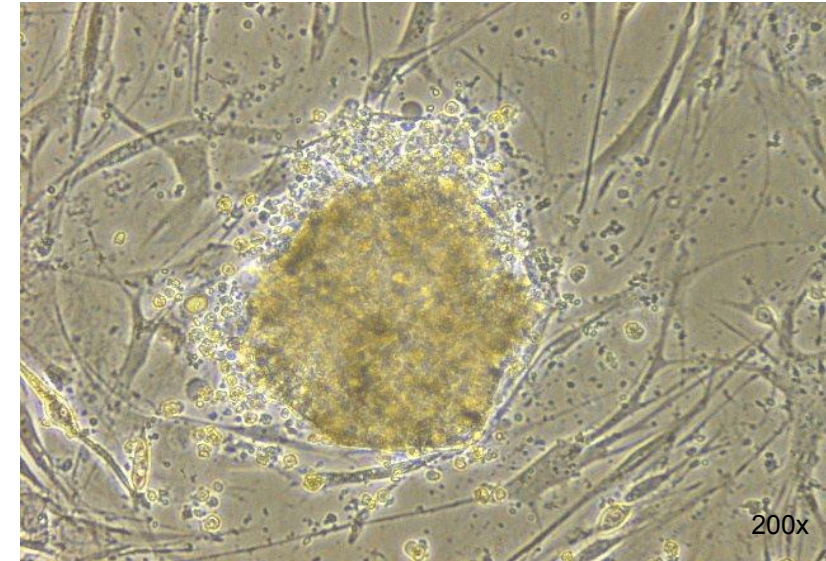
PBMCs



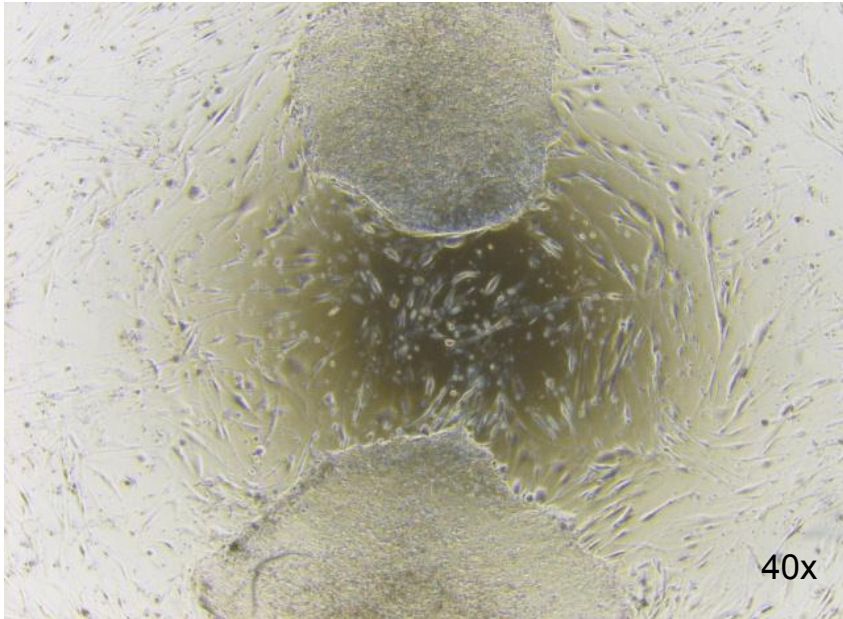
Dia 17



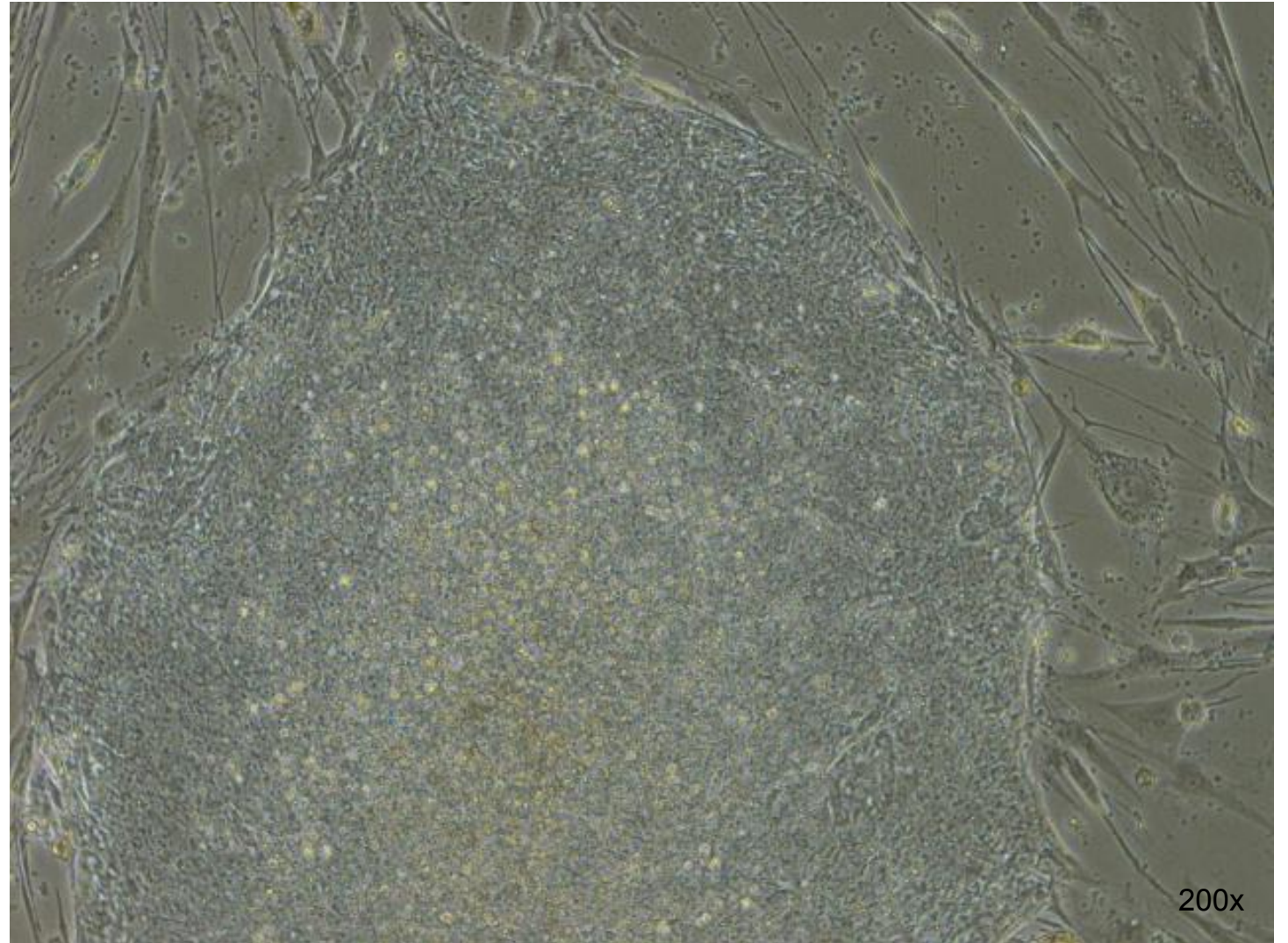
Dia 22



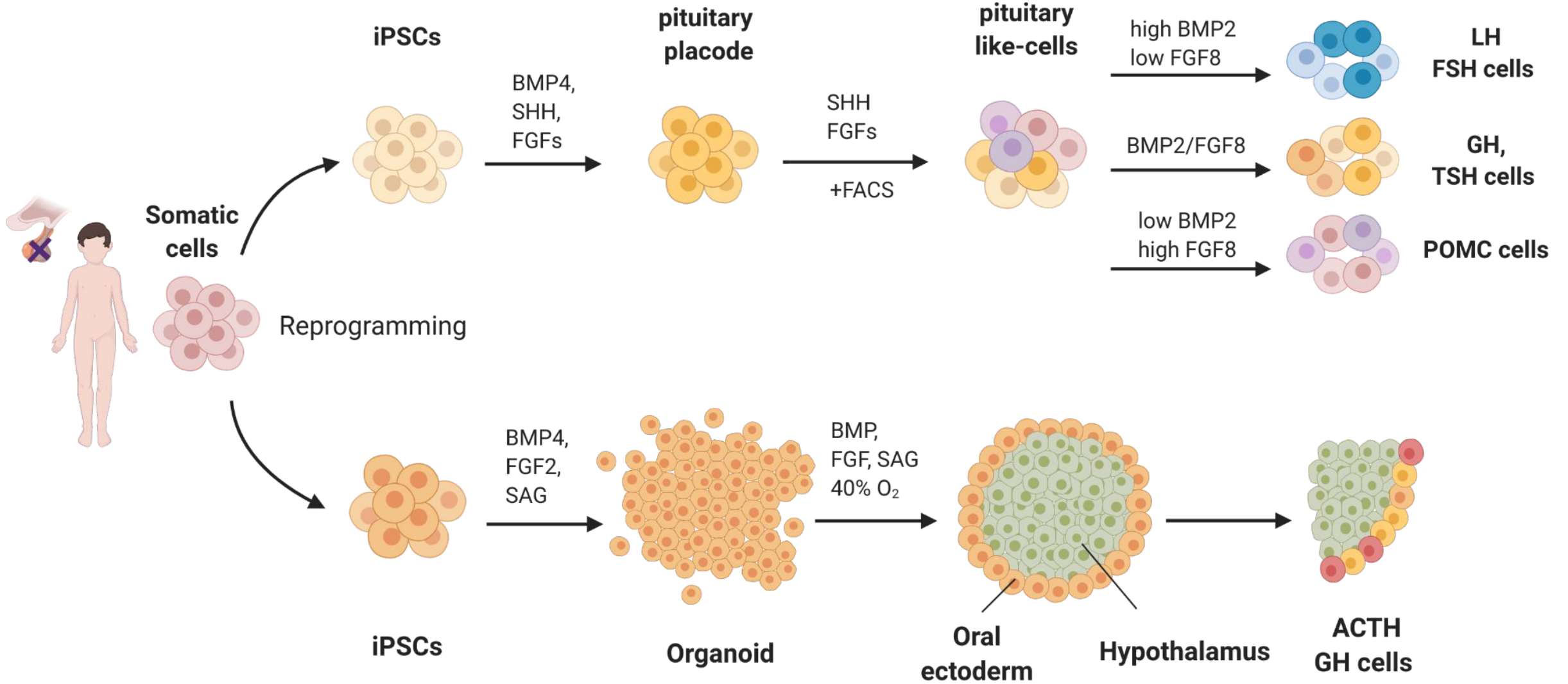
Ensayos en iPSCs



Día 35 ya vemos colonias individuales



De iPSCs a células hipofisarias



Testeos funcionales *in vivo*

Ventajas

- Más robusto que modelos *in vitro*
- Reproducción de resultados fisiológicos
- Barato para un número limitado de variantes



Desventajas

- Más lento que el testeo *in vitro*
- Imposibilidad de realizarlo para todos los genes
- Difícil de escalar



Testeo funcional de variantes en zebrafish (*D. rerio*)

Ventajas

- Alta conservación de un gran número de genes
- Fácil manipulación genética y transcripcional
- Desarrollo temprano rápido
- Gran número de embriones por cruce
- Costo menor que otros modelos animales

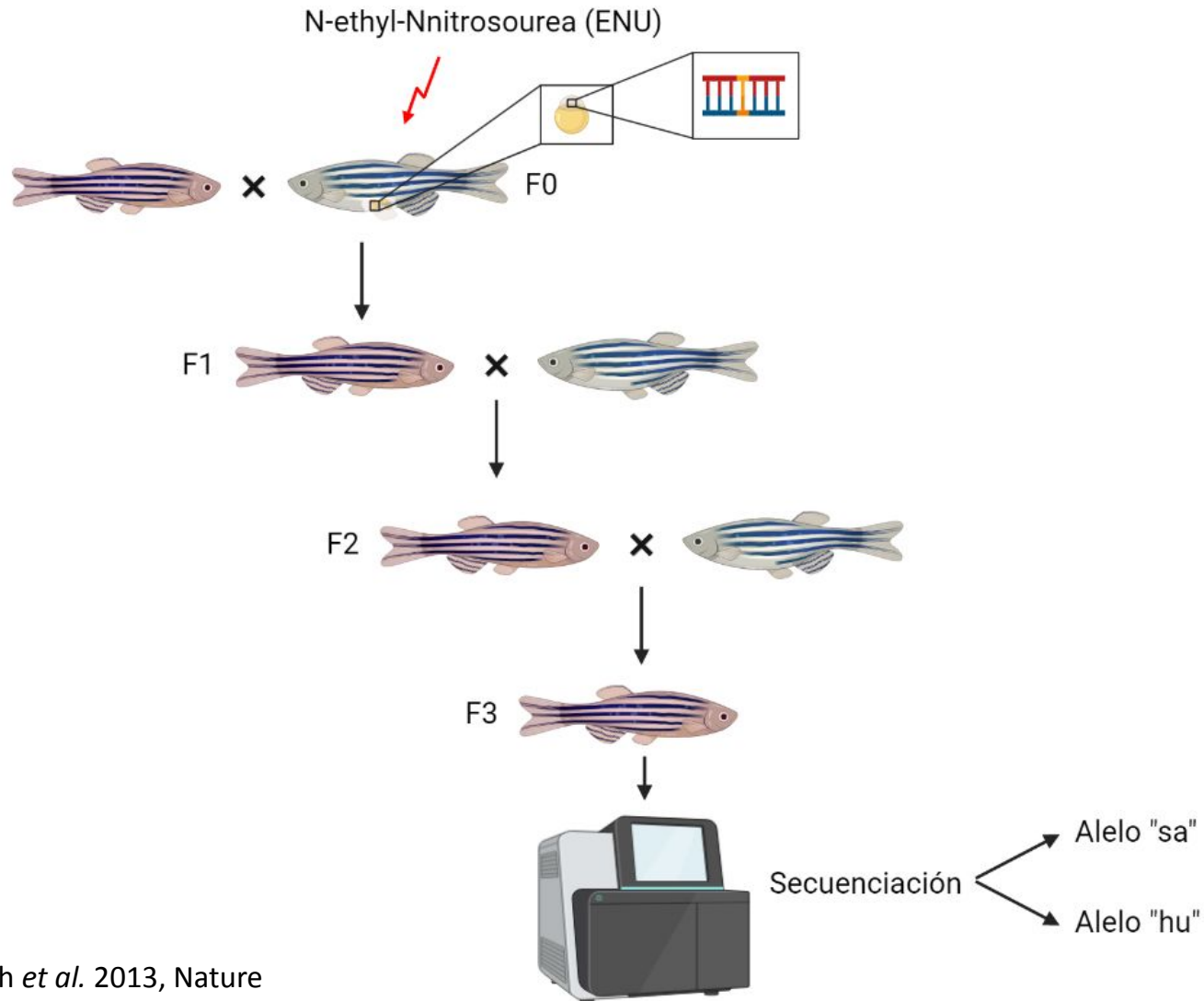


Desventajas

- Más lento que el testeo *in vitro*
- Duplicación genómica
- Alta divergencia comparado con otros modelos



Mutagénesis al azar: Zebrafish Mutation Project



- Permite estudiar genes
- Método masivo y no dirigido

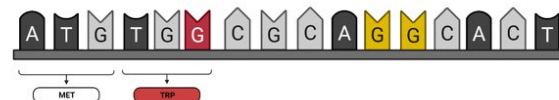
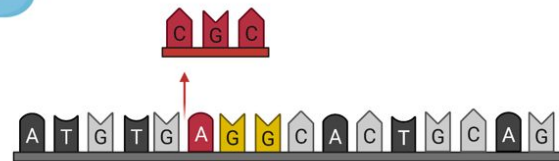
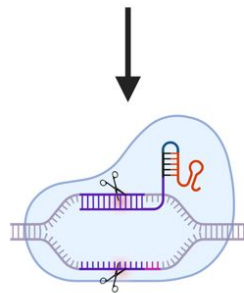
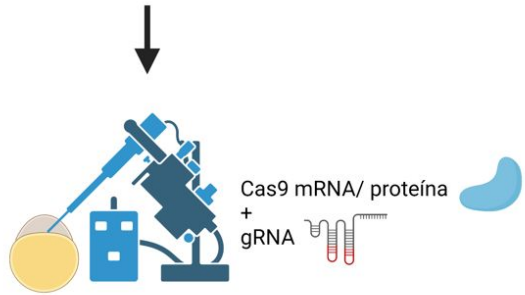
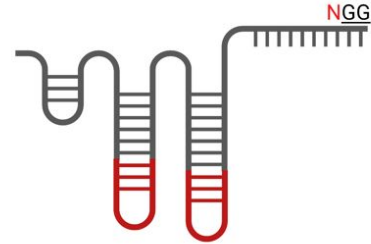
- Construcción de librerías
(EZRC/ZIRC/CZRC)

Mutagénesis dirigida por CRISPR

CRISPRscan CRISPOR CHOPCHOP 

Secuencia PAM (Cas9)

NGG



- Permite estudiar genes y variantes
- Conservación del gen (duplicaciones)
- Conservación del aminoácido

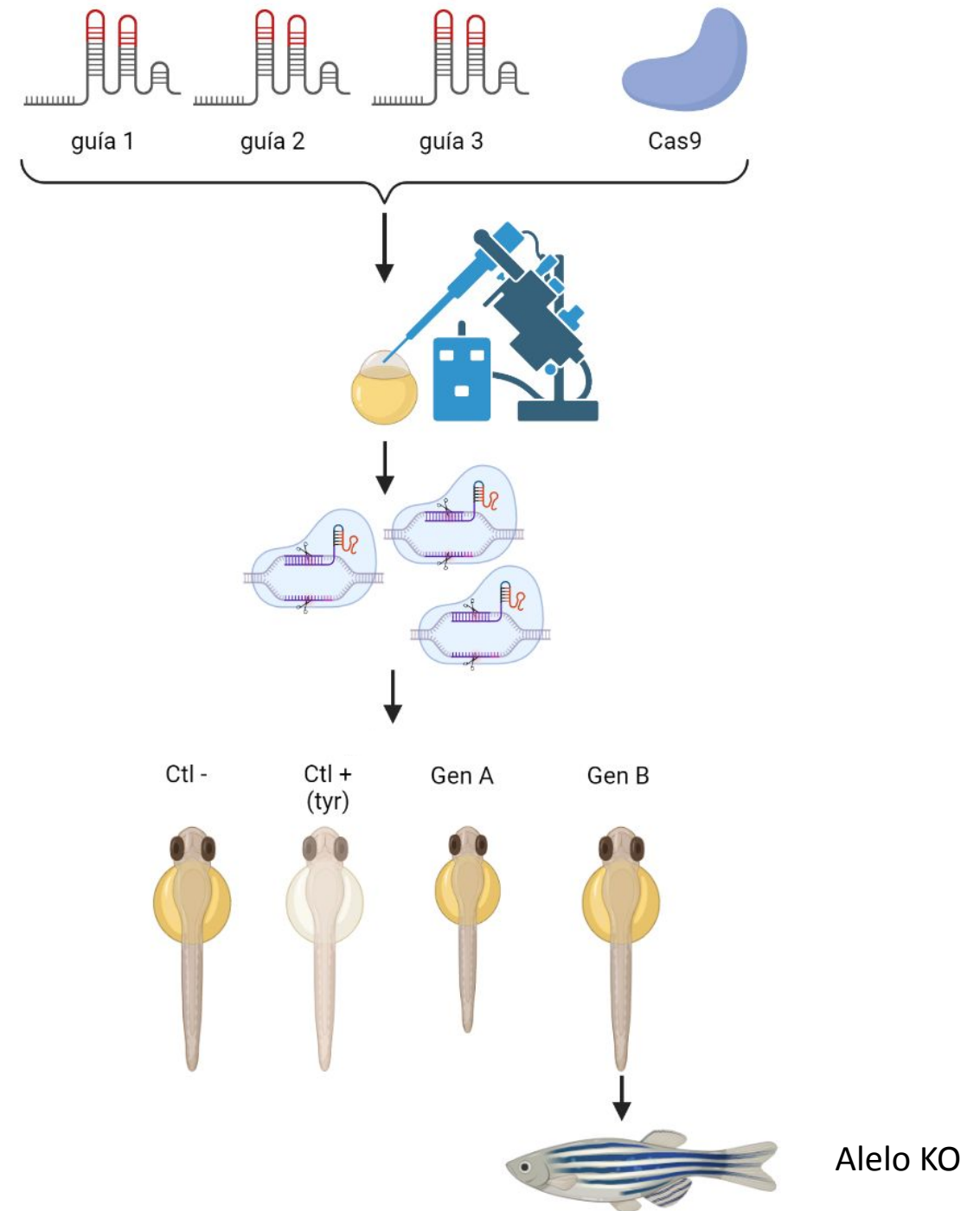
Alelo KO (Gen/Variante)

Equivalente a alelos "sa"/"hu"

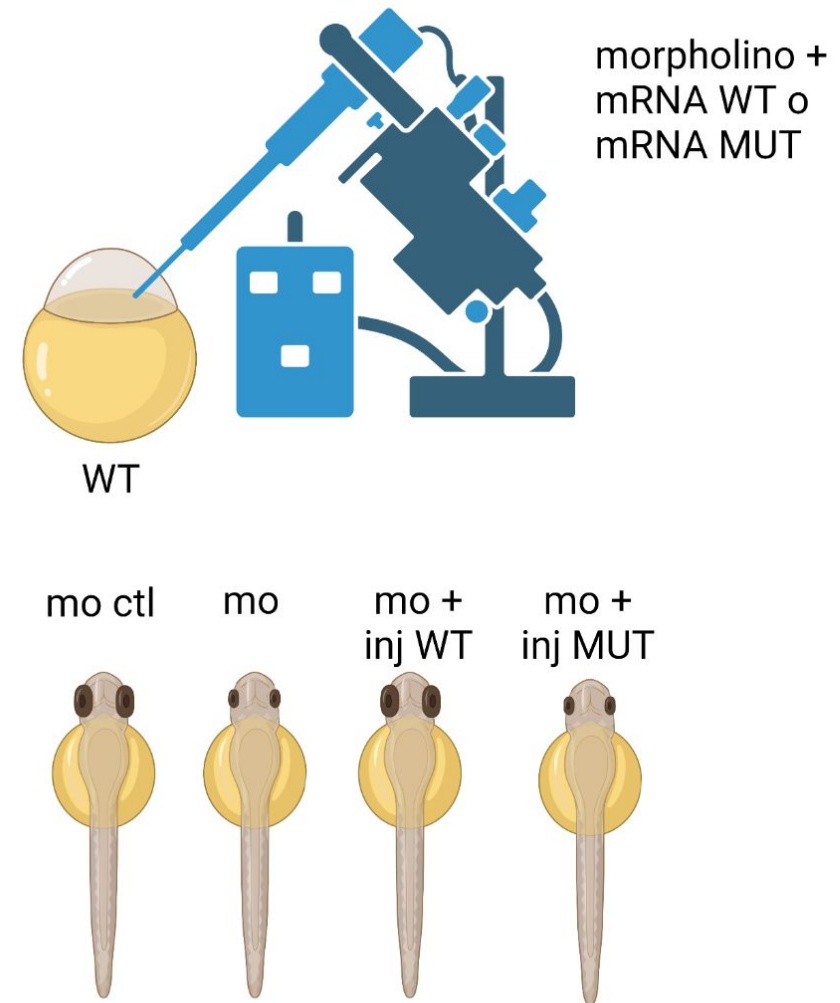
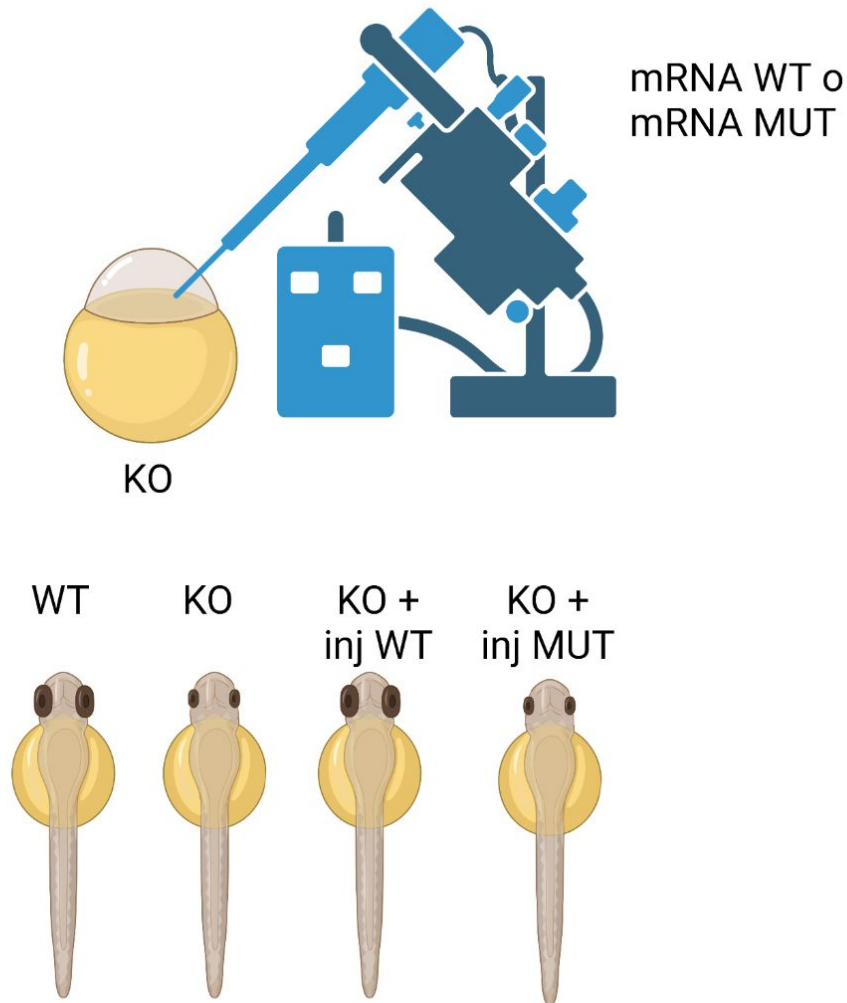
Alelo mutante (Variante)

CRISPRants

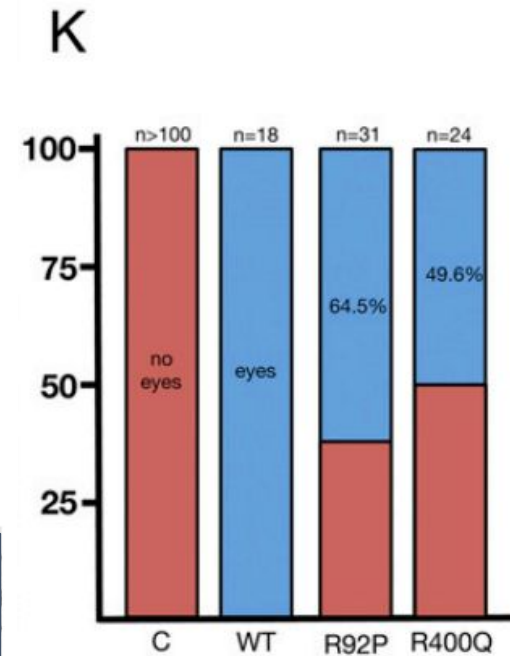
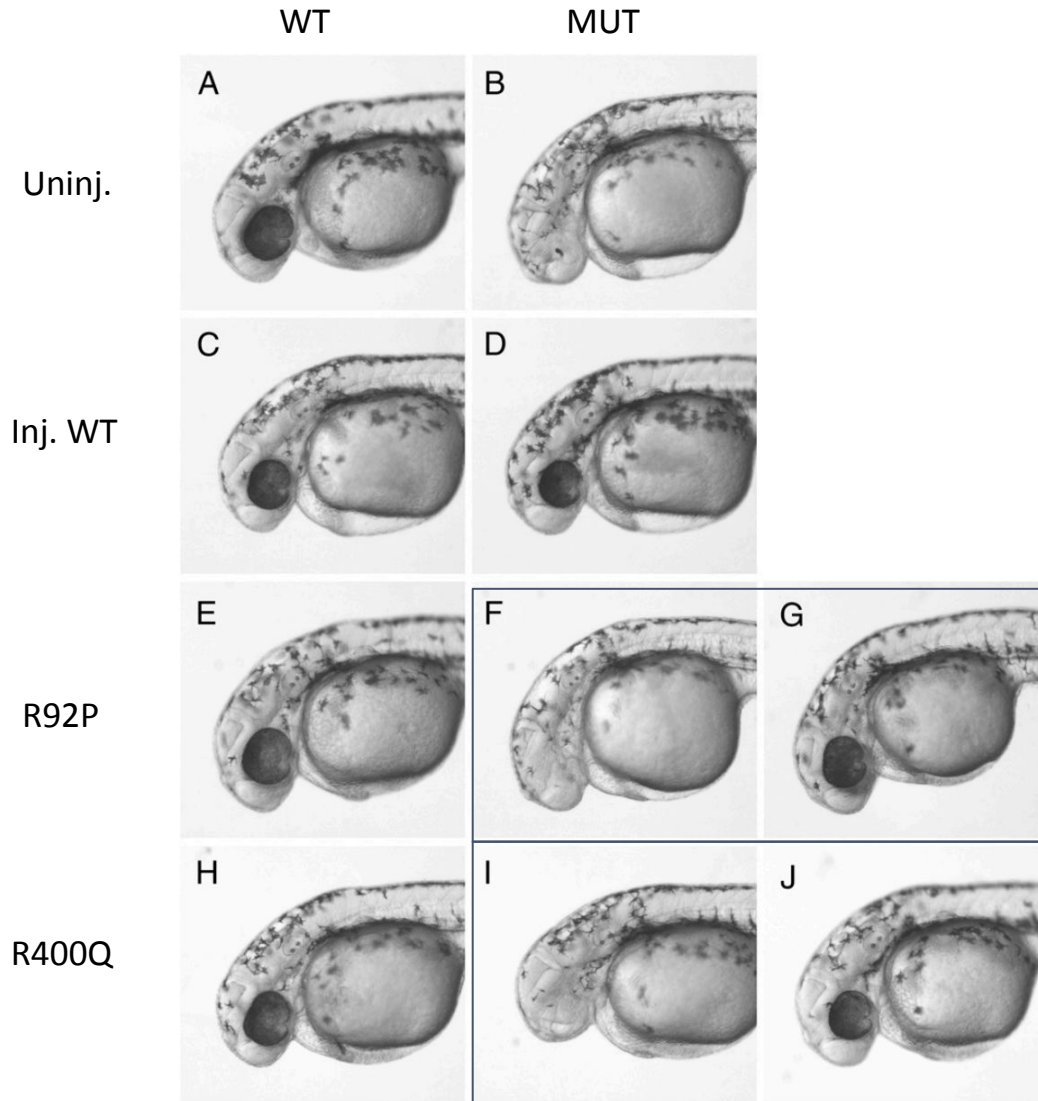
- Permite estudiar genes
- Generación de mosaicos embrionarios mutantes
- Permite testear múltiples genes en poco tiempo
- Permite generar alelos KO al igual que métodos tradicionales
- Mayor prevalencia de off-targets



Estudio de variantes: Ensayos de rescate



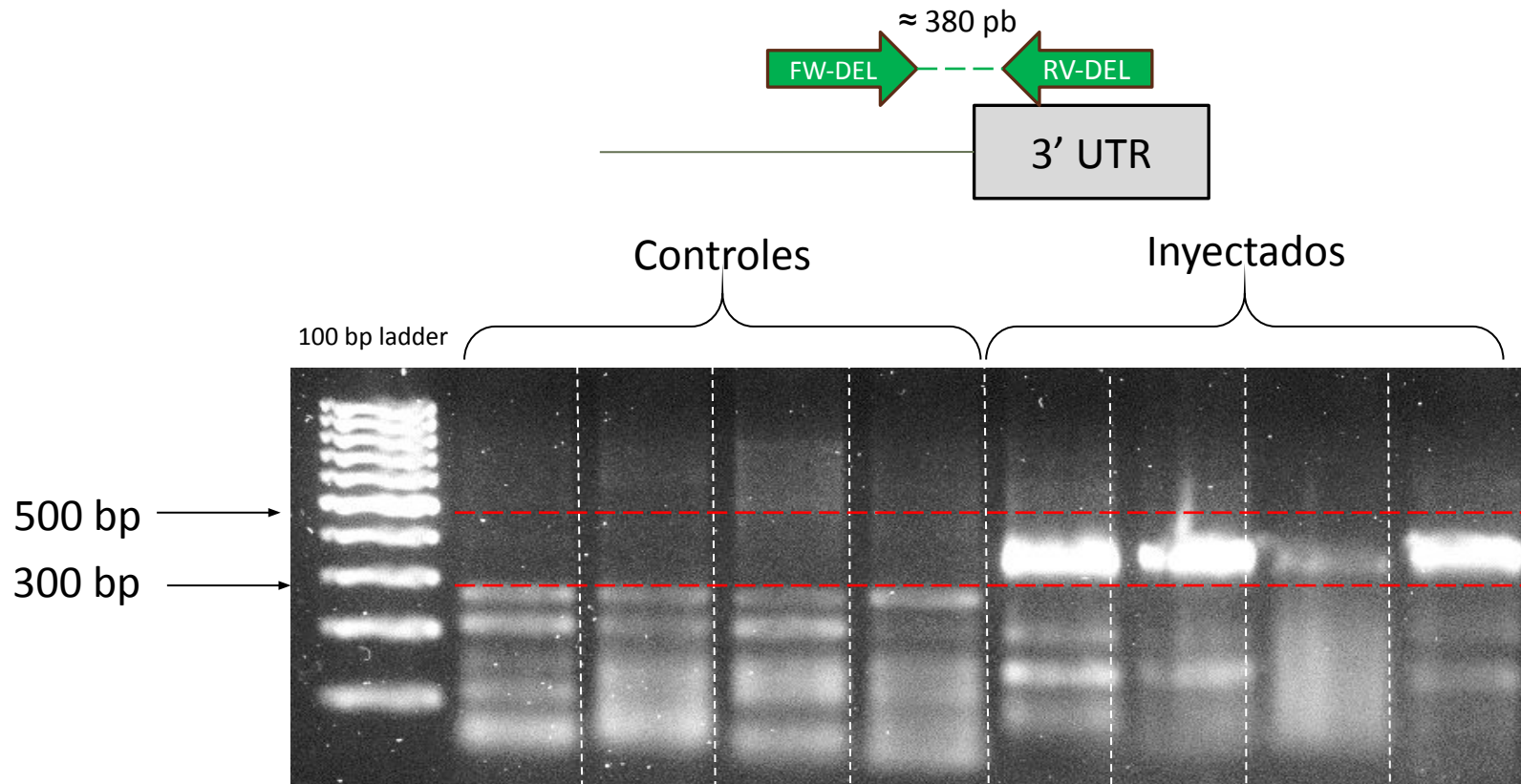
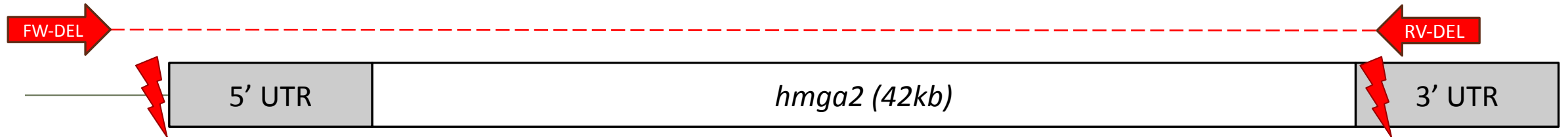
Ejemplo de nsayos de rescate - *tcf7l1*



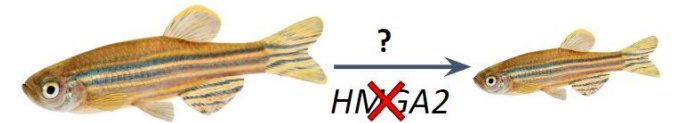
Gaston-Massuet *et al.* 2016, PNAS

- *TCF7L1* es un gen novel en deficiencias hipofisarias
- Los mutantes para su homólogo en zebrafish no desarrollan ojos
- Mutaciones de pacientes rescatan el fenotipo de manera parcial

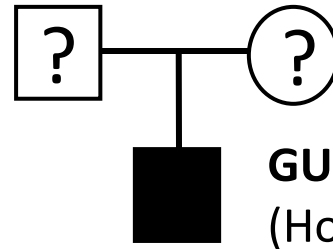
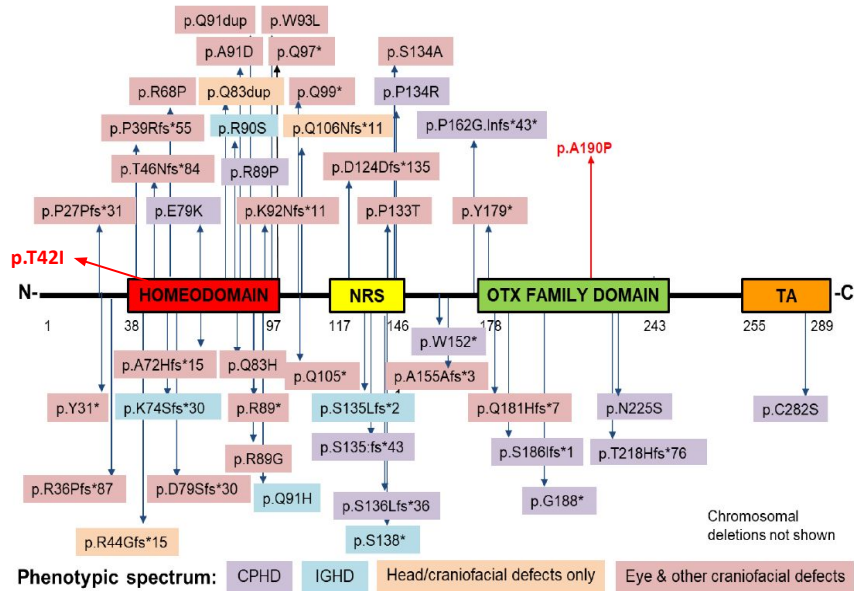
Delección del locus completo de *hmga2* mediante CRISPR



Caracterización fenotípica



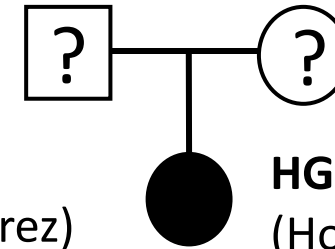
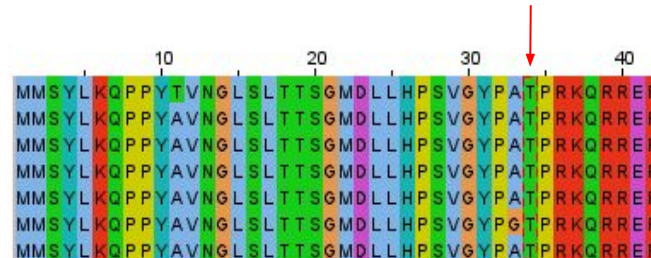
Caso conocido: *OTX2*



Clinical manifestations: CPHD
OTX2 genotype: **p.T42I (Het.)**
Age of diagnosis: 13
Height SDS at birth: NA
MRI: Adeno hypoplasia. EPP.
 Tallo fino

LP

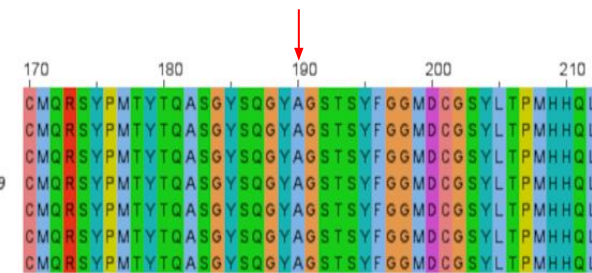
Dog/1-289
 Cat/1-289
 Mouse/1-289
 Chimpanzee/1-289
 Zebrafish/1-289
 Human/1-289
 Chicken/1-289



Clinical manifestations: IGHD
OTX2 genotype: **p.A190P (Het.)**
Age of diagnosis: 9 years
Height SDS at birth: -5.59
MRI: Adeno hypoplasia. EPP. Tallo ausente

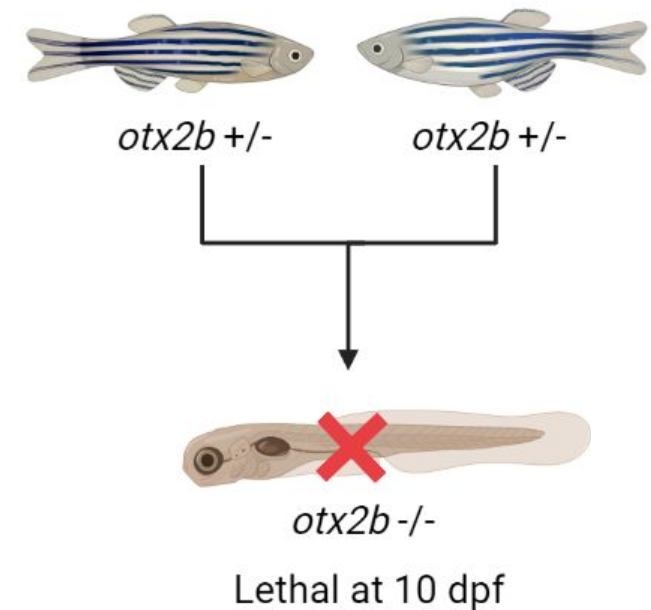
VUS

Dog/1-289
 Cat/1-289
 Mouse/1-289
 Chimpanzee/1-289
 Zebrafish/1-289
 Human/1-289
 Chicken/1-289

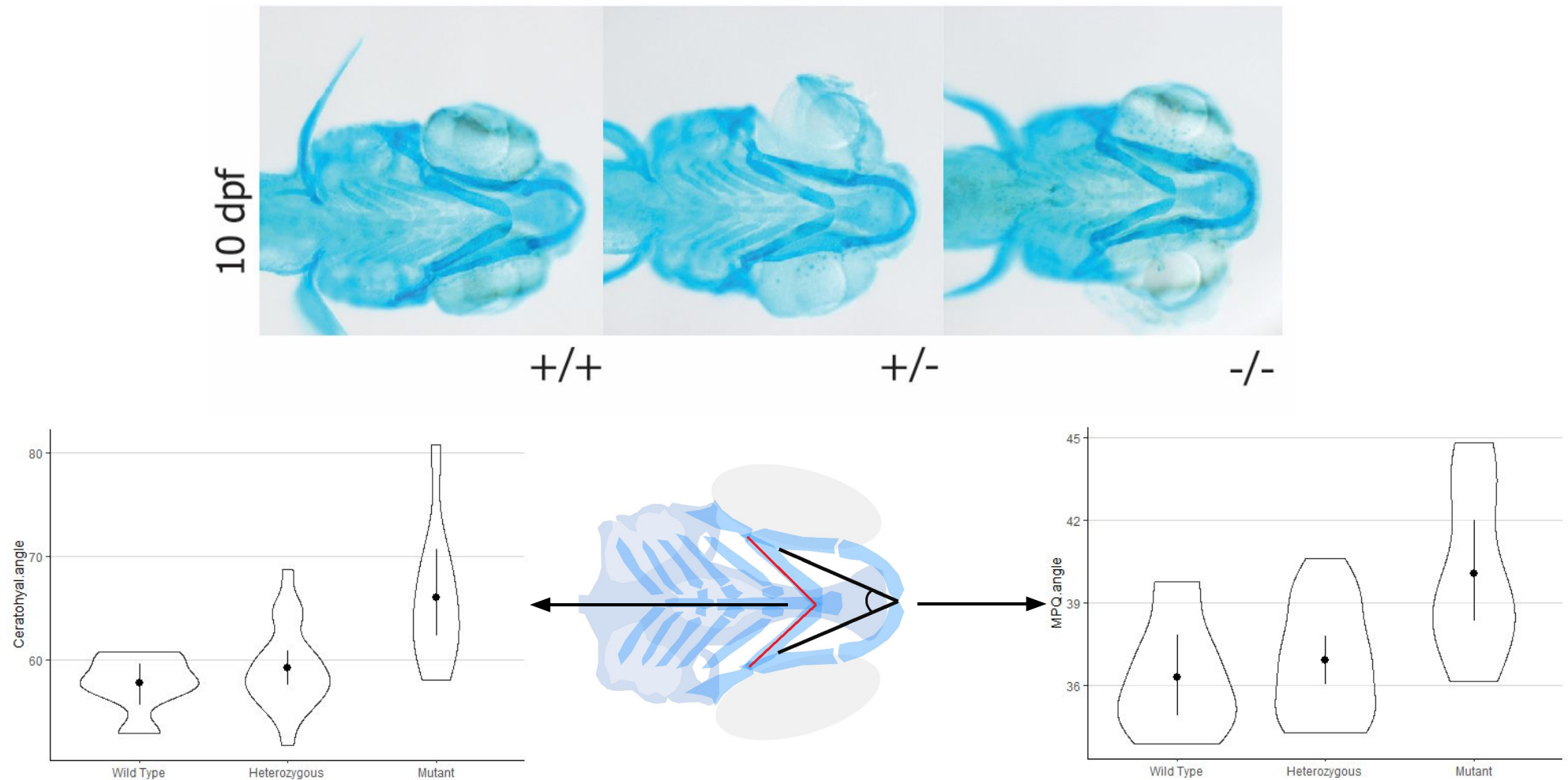


Caracterización de un modelo *otx2b* mutante de zebrafish (sa36505)

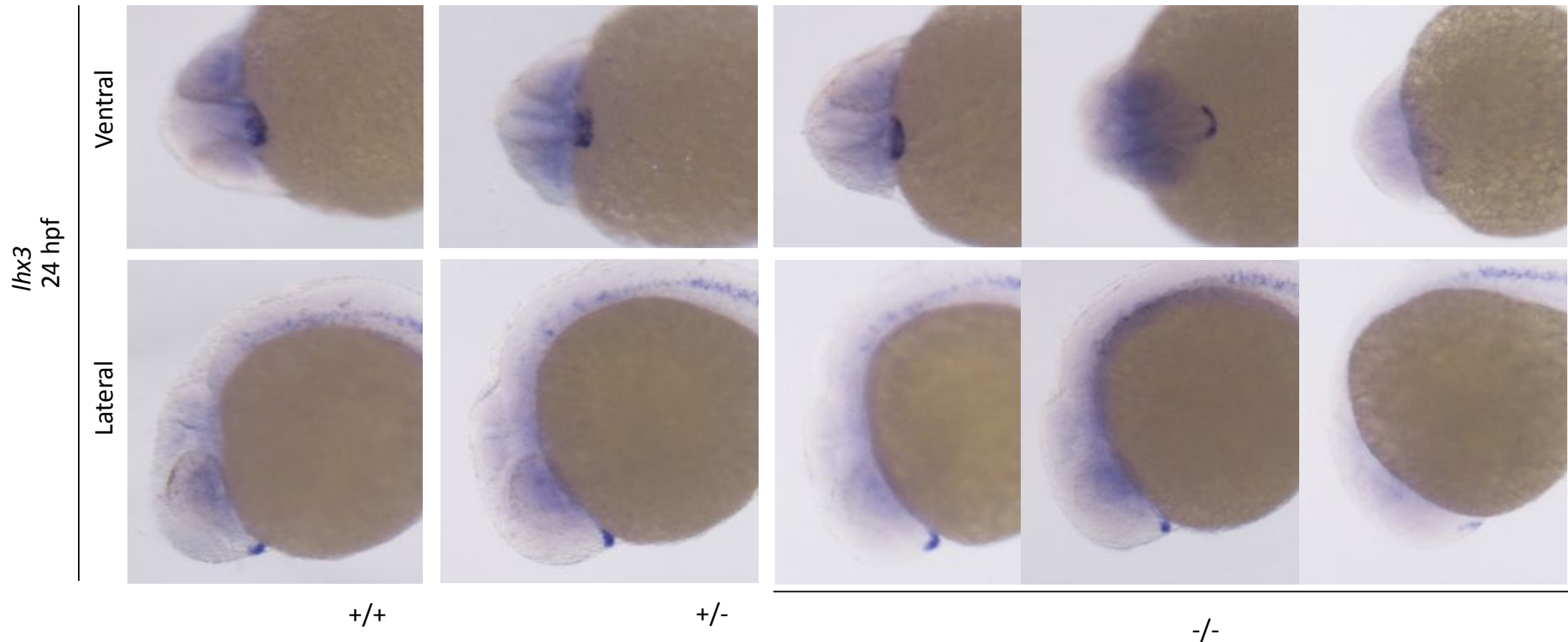
- Alta conservación (>90%)
- Gran número de variantes VUS
- Gen poco explorado en CPHD
- Alelo representativo de una variante humana patogénica sin estudios funcionales (p.Q99*)



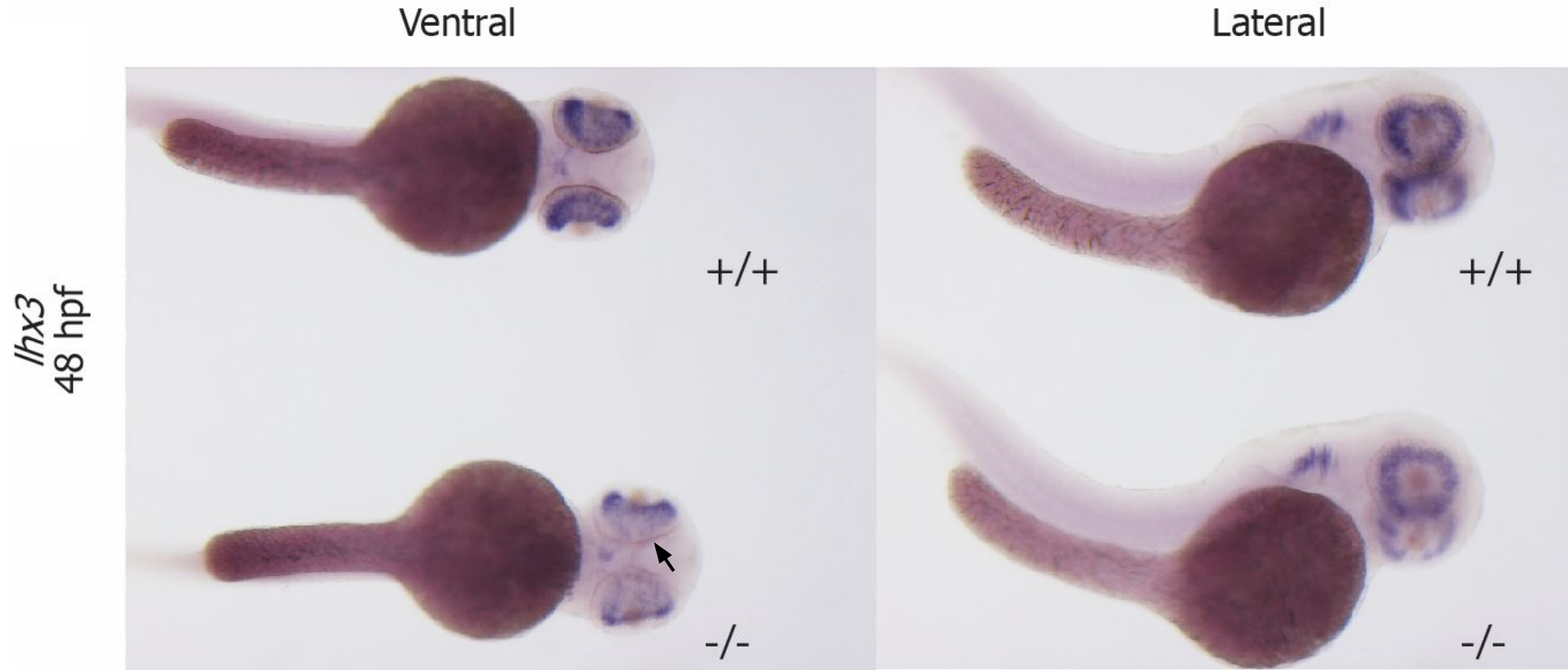
Caracterización de un modelo *otx2b* mutante de zebrafish (sa36505)



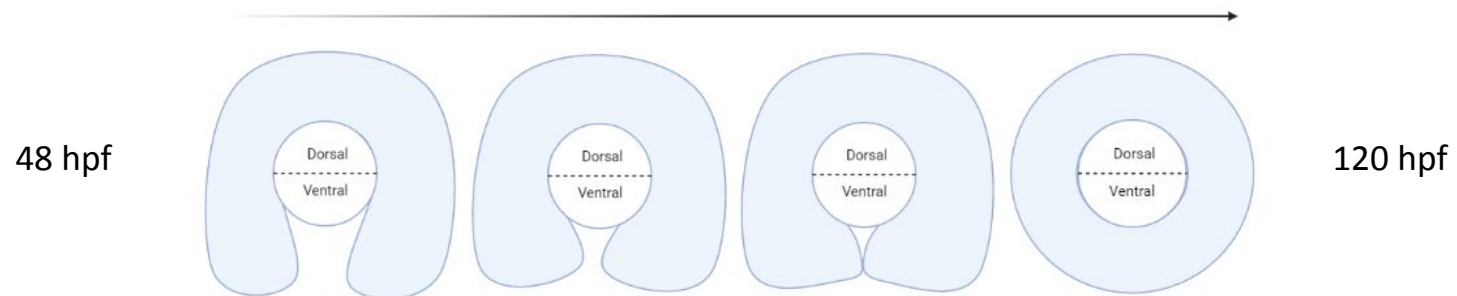
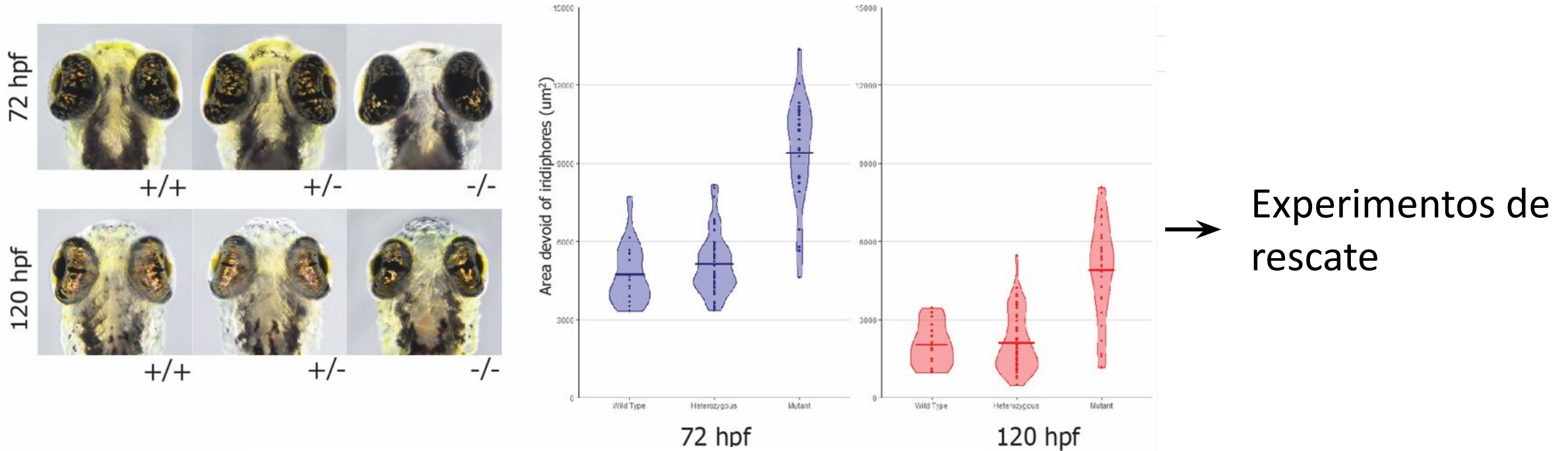
Caracterización de un modelo *otx2b* mutante de zebrafish (sa36505)



Caracterización de un modelo *otx2b* mutante de zebrafish (sa36505)



Caracterización de un modelo *otx2b* mutante de zebrafish (sa36505)



A modo de cierre



Los ensayos funcionales representan una valiosa herramienta a la hora de definir la patogenicidad de una variante



En particular si son VUS, y más aún si se encuentran en genes novedosos para la patología



Suelen ser ensayos \$\$, por lo tanto, es esencial definir QUÉ variantes TESTEAR a nivel funcional



La estrategia a elegir en lo experimental dependerá un poco de la variante en sí, el gen, lo reportado y la disponibilidad de hacerlo en el laboratorio

Laboratorio de Genética Molecular en Endocrinología

- María Inés Pérez Millán
- Sebastián Vishnopolska
- Augusto Chaves Murriello
- Lucia Iglesias Garcia
- Gonzalo Chirino Felker

Laboratorio de Bioinformática IQUBICEN – FCEN – UBA

- Marcelo Martí
- Jonathan Zaiat
- Federico Olivieri
- Franco Brunello

Department of Human Genetics University of Michigan



- Sally Camper Lab
- Michelle Brinkmeier
- Amanda Winningham
- Jacob Kitzman



Laboratorio de Investigaciones Aplicadas a las Neurociencias LIAN - INEU -CONICET

- Santiago Miriuka
- Lucia Moro
- Ariel Waisman
- Guadalupe Amin
- Sheila Castañeda



Hospital de Pediatría "Prof. Dr. J. P. Garrahan" - Servicio de Endocrinología

Alicia Belgorosky - Marta Ciaccio - Isabel Di Palma - R Mariño - P Ramírez - N Pérez Garrido - Elisa Vaiani

Hospital de Niños R. Gutiérrez - CEDIE

Ignacio Bergadá - Débora Braslavsky - Ana Keselman

Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Servicio de Endocrinología Pediátrica

Verónica Forclaz - Gabriela Benzrihen - Silvia D'Amato S - Gabriela Rojas

Hospital de Niños de la Santísima Trinidad Universidad Nacional de Córdoba

Mirta Miras

Hospital Italiano, Servicio de Endocrinología Pediátrica

Alonso Guillermo

Hospital General de Niños Pedro de Elizalde, Buenos Aires

Figueroa Veronica

Hospital Materno Infantil Dr Hector Quintana, Jujuy

Arias Cau C

Hospital Militar Central

Susana Mallea Gil - Laura Latorre - Carolina Ballarino

Hospital Sor Maria Ludovica

Analía Morin

FLENI, Débora Katz
Hospital Durand, Mirtha Guitelman

Nuestro grupo de trabajo

Laboratorio de Genética Molecular en Endocrinología



Instituto de Biociencias,
Biotecnología y
Biología traslacional



María Inés Pérez Millán
Sebastián Vishnopolaska
Lucía Candela Iglesias
Augusto Chaves Murriello
Gonzalo Tomás Chirino Felker