

Otología y Neurología

Activación de genes endógenos humanos de precursores óticos y de células ciliadas del oído interno mediante crispr-*vp160*

*Activation of endogenous human atoh1, pou4f3, sox2 and gfi1 inner ear genes by crispr-*vp160* technology*

*Ativação de genes endógenos humanos de precursores e células ciliadas do ouvido interno por meio de crispr-*vp160**

Dra. Gabriela Pérez-Raffo ^(1,2), Dra. Lucía Vigezzi ⁽²⁾, Lic. Carla Giménez ⁽²⁾,
Dr. Carlos Boccio ⁽¹⁾, Dr. Marcelo Rivolta ⁽³⁾, Dr. Federico Pereyra-Bonnet ⁽²⁾

Resumen

Introducción: Últimas investigaciones en la biología celular y molecular del oído interno han aportado evidencias que apoyan nuevas modalidades terapéuticas en medicina regenerativa para restablecer la audición. Recientemente se ha utilizado el sistema CRISPR-VP160 para mejorar los ensayos de reprogramación celular de manera *in vitro* e *in vivo*. CRISPR-VP160 se compone de una endonucleasa desactivada (dCas9) fusionada con dominios de activación de la transcripción (VP160), que utilizan un ARN guía para localizar un gen target y activarlo. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el sistema CRISPR-VP160 puede activar la expresión de genes del oído interno (*SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* Y *GFI1*) en la línea celular HEK293T.

Material y método: Se diseñaron cuatro ARN guías que reconocieran al promotor de cada gen target, usando la herramienta de diseño CRISPR (Feng Zhang Lab, MIT). Los ARN guías se clonaron en el plásmido Addgene#47108 y se lipofectaron junto al plásmido dCas9-VP160 (Addgene#48226), en una relación de 1:1 en las células HEK293T. Las células del grupo control fueron cotransfectadas con el plásmido dCas9-VP160 y un plásmido guía vacío.

Los resultados fueron analizados por RT-qPCR al día 4 post-lipofección.

Resultados: El sistema CRISPR-VP160 activó significativamente a *SOX2*, *ATOH1* y *POU4F3* ($p < 0.05$), mientras que no se observó una activación significativa de *GFI1*, fenómeno que podría explicarse por la expresión preexistente de este gen en la línea celular.

Conclusiones: En un futuro, el sistema CRISPR-VP160 podría emplearse para mejorar las estrategias de reprogramación de células, para desarrollar nuevas terapias celulares en pacientes hipoacúsicos.

Palabras clave: Hipoacusia, CRISPR, células ciliadas, oído interno.

Abstract

Introduction: Recent researches in cell and molecular biology of the inner ear bring evidence that helps the development of new therapeutic practice in regenerative medicine to restore hearing. The CRISPR system has been used to improve cell reprogramming assays both *in vitro* and *in vivo*. This consists of the inactive DNA-nuclease Cas9 (dCas9) fused to activation domains and co-expressed single guide RNAs (sgRNAs) that are designed

⁽¹⁾ Médicos ORL del Hospital Italiano de Buenos Aires Servicio de Otorrinolaringología, C.A.B.A., Argentina.

⁽²⁾ Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB). Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA) - Instituto Universitario del HIBA - CONICET. C.A.B.A., Argentina.

⁽³⁾ Centre for Stem Cell Biology. Department of Biomedical Science. The University of Sheffield United Kingdom.

Mail de contacto: gabriela.perezraffo@hospitalitaliano.org.ar

Fecha de envío: 17 de septiembre de 2018 - Fecha aceptación: 22 de octubre de 2018.

to hybridize a target sequence. Combined, these elements recognize a target locus and activate a specific gene. The objective of this work was to evaluate whether CRISPR-on system fused with transcriptional activators (dCas9-VP160) could activate gene expression of inner ear genes (SOX2, ATOH1, POU4F3 and GFI1) in HEK293T cell line.

Material and method: Four guides were designed to recognize the proximal promoter of each target gene, using the CRISPR design tool (Feng Zhang Lab, MIT). The sgRNAs were cloned into plasmid Addgene#47108 and lipofected together with plasmid dCas9-VP160 (Addgen#48226), at a mass ratio of 1:1 in HEK293T cells. Control group was co-lipofected with plasmid dCas9-VP160 and an empty guide plasmid. The results were analyzed by RT-qPCR at day 4 post-lipofection.

Results: The CRISPR-VP160 system significantly activated SOX2, ATOH1 and POU4F3 ($p < 0.05$), whereas it did not detect a significant activation of GFI1. This phenomenon could be explained by the preexisting expression of this gene in HEK293T cells.

Conclusions: In the future, the CRISPR-VP160 system could be used to improve reprogramming strategies of cells, to develop new cellular therapies in hearing-impaired patients.

Key words: Hearing loss, CRISPR, hair cells, inner ear.

Resumo

Introdução: Novas pesquisas em biologia celular e molecular do ouvido interno ajudam para novas práticas terapêuticas na medicina regenerativa para restaurar a audição. O sistema CRISPR foi usado para melhorar os ensaios de reprogramação celular. O sistema CRISPR-on consistem na nuclease de ADN inactiva cas9 (dCas9) fundido com domínios de activação de ARN de orientação único co-expressa (sgRNAs) são concebidos para hibridar que uma sequência alvo. Combinados, esses elementos reconhecem um locus alvo e ativam um gene específico. O objetivo deste trabalho foi determinar se o sistema CRISPR fundido com ativadores da transcritor (dCas9-VP160) é capaz de ativar a expressão de genes no ouvido interno (SOX2, Atoh1, POU4F3 E GFI1) na linha de células HEK293T.

Material e método: Quatro guias foram projetados para reconhecer o promotor de cada gene, usando a ferramenta de projeto CRISPR (Feng Zhang Lab, MIT). Guias de ARN foram clonados no plasmídeo Addgene#47108 e lipofecção pelo plasmídeo dCas9-VP160 (Addgene#48226) numa proporção de 1:1 em células HEK293T. As células do grupo de controlo foram co-transfectadas com o plasmídeo dCas9-

VP160 e um plasmídeo guia vazio. Os resultados foram analisados por RT-qPCR no dia 4 pós-lipofecção.

Resultados: O sistema CRISPR-VP160 activa significativamente SOX2, Atoh1 e POU4F3 ($p < 0,05$), en quanto a activação significativa do GFI1 não foi detectada, fenómeno que poderia ser explicado pela expressão preexistente desta gene na HEK293T.

Conclusões: No futuro, o sistema CRISPR-VP160 poderia ser usado para melhorar as estratégias de reprogramação de células, para desenvolver novas terapias celulares em pacientes com deficiência auditiva.

Palavras-chave: Perda auditiva, CRISPR, células ciliadas, ouvido interno.

Introducción

La hipoacusia o la disminución de la sensibilidad auditiva es una de las discapacidades más frecuentes en países industrializados. La OMS estima que la hipoacusia incapacitante en la actualidad afecta a 360 millones de personas en el mundo, de los cuales 32 millones son niños de entre 0 y 14 años. ⁽¹⁾ La mayor exposición al ruido y el uso de dispositivos electrónicos portátiles contribuyen al aumento de la incidencia de esta patología. ⁽²⁾

La hipoacusia puede ser conductiva, cuando el daño ocurre en el conducto auditivo externo o en el oído medio; o neurosensorial, cuando el daño ocurre en el oído interno o en el nervio auditivo. El ser humano nace con alrededor de 16.000 células ciliadas por cóclea y 30.000 neuronas auditivas. ⁽³⁾ Las células ciliadas son las traductoras mecanoeléctricas del oído, la deflexión de sus cilias en su extremo apical se transmite hacia el polo opuesto dando lugar al potencial de acción del nervio auditivo. ⁽⁴⁾ Por otro lado, el 80% de las hipoacusias neurosensoriales (HNS) se deben a lesiones o pérdidas de estas células ciliadas o de sus neuronas asociadas. ⁽⁴⁾ La cóclea adulta del mamífero carece de capacidad regenerativa y esta es la razón fundamental por la cual la hipoacusia neurosensorial es irreversible. ⁽³⁾ En la actualidad las opciones terapéuticas para el 20% de las personas que padecen hipoacusia neurosensorial son los dispositivos de amplificación como los audífonos, la estimulación eléctrica del nervio auditivo a través del implante coclear ^(1,5), la estimulación eléctrica de la superficie del núcleo coclear por medio del implante de tronco cerebral y, finalmente, para aquellos pacientes que no se benefician con ninguna de las prótesis antes mencionadas, se ha comenzado con ensayos clínicos de una prótesis diseñada para estimular el folículo inferior. ^(6,7)

Estos dispositivos mejoran en gran medida la calidad de vida de la mayoría de sus usuarios, pero no restablecen la capacidad y calidad auditiva de los pacientes hasta niveles normales. Es por ello que la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos sigue siendo hoy una realidad. Las investigaciones en la biología del desarrollo, la genética y la biología celular del oído interno han aportado información, que está siendo traducida a nuevas modalidades terapéuticas en medicina regenerativa para restablecer una audición normal. (8) Varios trabajos demuestran que las células ciliadas auditivas pueden obtenerse in vivo e in vitro mediante ensayos de reprogramación de células madre obtenidas a partir de diferentes tejidos, (9-12) cuando son tratadas en condiciones definidas. (13-15) Sin embargo, al día de hoy no existe una terapia de reemplazo celular que incluya el uso de células madre para tratar hipoacusia que haya sido aprobada por las distintas agencias reguladoras en el mundo (INCUCAI-ANMAT, FDA, PMDA, EMA). Esto pone de manifiesto la necesidad de seguir investigando para desarrollar un tratamiento de reemplazo celular para restablecer la capacidad auditiva que demuestre seguridad y eficacia.

Si bien las estrategias de diferenciación utilizando señales exógenas en medios de cultivo definidos (utilización de pequeñas moléculas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) permiten obtener fenotipos similares a los maduros, nuevas estrategias están siendo exploradas para mejorar la reprogramación. Una de las herramientas más novedosas en el campo de la reprogramación celular es emplear del sistema CRISPR para modificar epigenéticamente un gen, y como consecuencia activarlo o silenciarlo. CRISPR consiste en un vector que codifica para un ARN guía complementario a la secuencia del gen target (el gen que se pretende modificar), una proteína Cas9 inactivada que está asociada a otra proteína “modificadora” de la transcripción, por ejemplo, los dominios de activación de la transcripción génica VP160. (Fig. 1) CRISPR-VP160 se ha utilizado exitosamente en el IMTIB en protocolos de reprogramación celular para activar genes específicos (15) y en futuros ensayos la posibilidad de trabajar con el ARNm de estas construcciones facilitará su desembarco en la clínica.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el sistema CRISPR-VP160 es capaz de activar la expresión de genes precursores óticos y de células ciliadas del oído interno: *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* Y *GF11*, in vitro en la línea celular HEK293T.

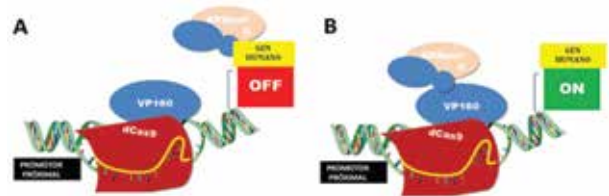


Figura 1: Esquema del sistema CRISPR-VP160. Las hebras amarillas representan la molécula de ARN sintética que localiza el gen de interés en el ADN (hebra verde). El complejo CRISPR-on ubica el complejo activador (A) y activa el gen (B).

Material y método

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB - CONICET-IUHI-HIBA). Para generar las sondas CRISPR, se diseñaron cuatro ARN guías (Tabla 1) que reconocieran al promotor proximal de cada gen target, usando la herramienta de diseño CRISPR (Feng Zhang Lab, MIT). Los ARN guías se clonaron en el plásmido Addgene # 47108 y se lipofectaron utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) junto al plásmido dCas9-VP160 (Addgene # 48226), en una relación de 1:1 en las células HEK293T. Las células del grupo control fueron colipofectadas con el plásmido dCas9-VP160 y un plásmido guía vacío. Los resultados fueron analizados por RT-qPCR al día 4 post-lipofección. Para tal fin se realizó la extracción del ARN de las células, a partir del cual se obtuvo el ADN copia (ADNc) mediante RT-PCR. Utilizando este ADNc se cuantificó el nivel de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney, considerando significativa una diferencia de $p < 0.05$.

| | |
|--------|-------------------------------|
| ATOH1 | Sonda 1: TTGCAGAAGAGACCCGGAA |
| | Sonda 2: TGTGTGATCTCCGAGTGGG |
| | Sonda 3: GCGCAGCGCCTTCAGCAAC |
| | Sonda 4: TGCTTCTCAGCCAATGGA |
| SOX2 | Sonda 1: CAAAACCCGCGCAGCGAGGC |
| | Sonda 2: CCGGCCGCGGGGGGAGGC |
| | Sonda 3: TATCCCTCTCGCAGCAAC |
| | Sonda 4: CGGGAAGCAGCTAAGGTGC |
| POU4f3 | Sonda 1: TACAAGCAGCCTGCCAGGAA |
| | Sonda 2: TGCTGTCTCTCCTCACCTCC |
| | Sonda 3: CTTTATACCCGGGCTGGCC |
| | Sonda 4: TCTGGCGGGTTGGAGCCAG |
| GF11: | Sonda 1: ACCACCGGAAATTAGTCGA |
| | Sonda 2: CAAAATTAAGGCCGCGCG |
| | Sonda 3: AGAGCGGGACCTCGCACGC |
| | Sonda 4: GCATACAGTCTAGCGTTGG |

Tabla 1: Secuencia de sondas para CRISPR.

Resultados y discusión

Los resultados de este trabajo revelaron que el sistema CRISPR-VP160 activó significativamente la transcripción de los genes *SOX2*, *ATOH1* y *POU4F3* ($p < 0.05$), mientras que no se detectó una activación significativa de *GFI1*, fenómeno que podría explicarse por la expresión preexistente de este gen en la línea celular (Fig. 2).

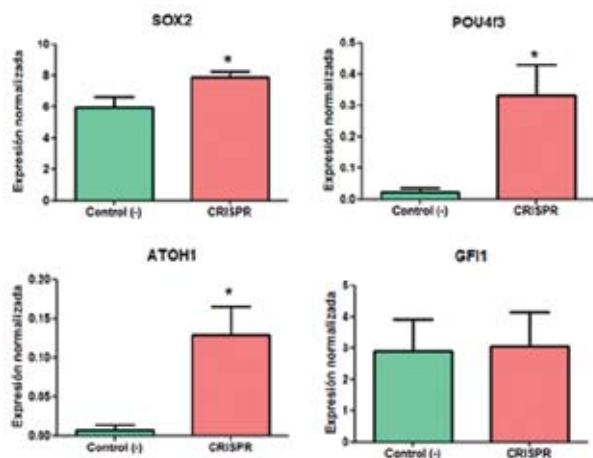


Figura 2: Cuantificación de la expresión de genes de precursores óticos y células ciliadas de oído interno mediante RT-qPCR en células Hek293 activadas con CRISPR-VP160.

En este trabajo se reportan los primeros cuatro ARN guías diseñados y validados por RT-qPCR para la activación endógena de cuatro genes humanos de importancia en el desarrollo y la diferenciación del oído interno. El desarrollo de esta novedosa tecnología impactará en la posibilidad de enfrentar un nuevo desafío biomédico denominado “terapia epigenética” (en líneas generales, esto se refiere a poder “apagar” o “prender” genes asociados a enfermedades o cambiar el patrón de genes activos para modificar la identidad celular).⁽¹⁶⁾ Recientemente, en esta área de reprogramación celular, colegas del IMTIB han hecho uso del sistema CRISPR-ON dentro del marco de un proyecto donde conviven la ciencia básica y la aplicada para brindar una alternativa terapéutica a la diabetes tipo I⁽¹⁵⁾, con resultados muy alentadores. De este modo, las evidencias apuntan a afirmar que la reprogramación celular tiene un enorme potencial en el campo de la medicina regenerativa con un futuro prometedor gracias, en gran parte, a los avances de la biología sintética como el sistema CRISPR-ON.

Conclusiones

Mediante la tecnología CRISPR-VP160 se lograron activar genes de precursores óticos y de células ciliadas maduras de oído interno. El próximo paso

es la puesta a punto de la lipofección en células madre mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo humano.

En un futuro, el sistema CRISPR-VP160 podría emplearse para mejorar las estrategias de reprogramación de células, para desarrollar nuevas terapias celulares en pacientes hipoacúsicos.

Los autores no manifiestan conflictos de interés.

Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. Evaluación multipaís de la capacidad nacional de prestación de atención audiológica. 2014;25.
- Ivory, R; Kane, R; Diaz R. Noise-induced hearing loss: a recreational noise perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;22(5):394-8. Recuperado a partir de: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00020840-201410000-00011>.
- Forge A, Li L, Nevill G. Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *J Comp Neurol.* United States; julio de 1998;397(1):69-88.
- Davis AC. Hearing disorders in the population: first phase of the MCR National Study of Hearing. En: Lutman M, Haggard M, editores. *Hearing Science and Hearing Disorders.* New York: Academic Press; 1993.
- Watters K, Corrales CE. Feasibility of treating hearing disorders with stem cells: update. *Ear Nose Throat J.* United States; octubre de 2004;83(10):686,688-689.
- Lim HH, Lenarz T, Anderson DJ, Lenarz M. The auditory midbrain implant: effects of electrode location. *Hear Res.* Netherlands; agosto de 2008;242(1-2):74-85.
- Lim HH, Lenarz T, Joseph G, Battmer R-D, Samii A, Samii M, et al. Electrical stimulation of the midbrain for hearing restoration: insight into the functional organization of the human central auditory system. *J Neurosci.* United States; diciembre de 2007;27(49):13541-51.
- Parker MA, Cotanche DA. The potential use of stem cells for cochlear repair. *Audiol Neurootol.* Switzerland; 2004;9(2):72-80.
- Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, Endo T, Yamada S, et al. Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport.* England; septiembre de 2003;14(13):1677-81.
- Liu Q, Shen Y, Chen J, Ding J, Tang Z, Zhang C, et al. Induction of Functional Hair-Cell-Like Cells from Mouse Cochlear Multipotent Cells. *Stem Cells Int.* United States; 2016;2016:8197279.
- Doyle KL, Kazda A, Hort Y, McKay SM, Oleskevich S. Differentiation of adult mouse olfactory precursor cells into hair cells in vitro. *Stem Cells.* United States; marzo de 2007;25(3):621-7.
- Kil K, Choi MY, Park KH. In Vitro Differentiation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Auditory Hair Cells and Neurons. *J Int Adv Otol.* 2016;12(1):37-42.
- Kokai LE, Rubin JP, Marra KG. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plast Reconstr Surg.* United States; octubre de 2005;116(5):1453-60.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 1999;96(19):10711-6.
- Giménez C, Ielpi M, Mutto A, Grosebacher L, Argibay P, F P-B. [CRISPR-on] system for the activation of the endogenous human [INS] gene. *Gene Ther.* 2016;23(6):543-7.
- De Groot ML, Verschure PJ, Rots MG. Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(21):10596-613.