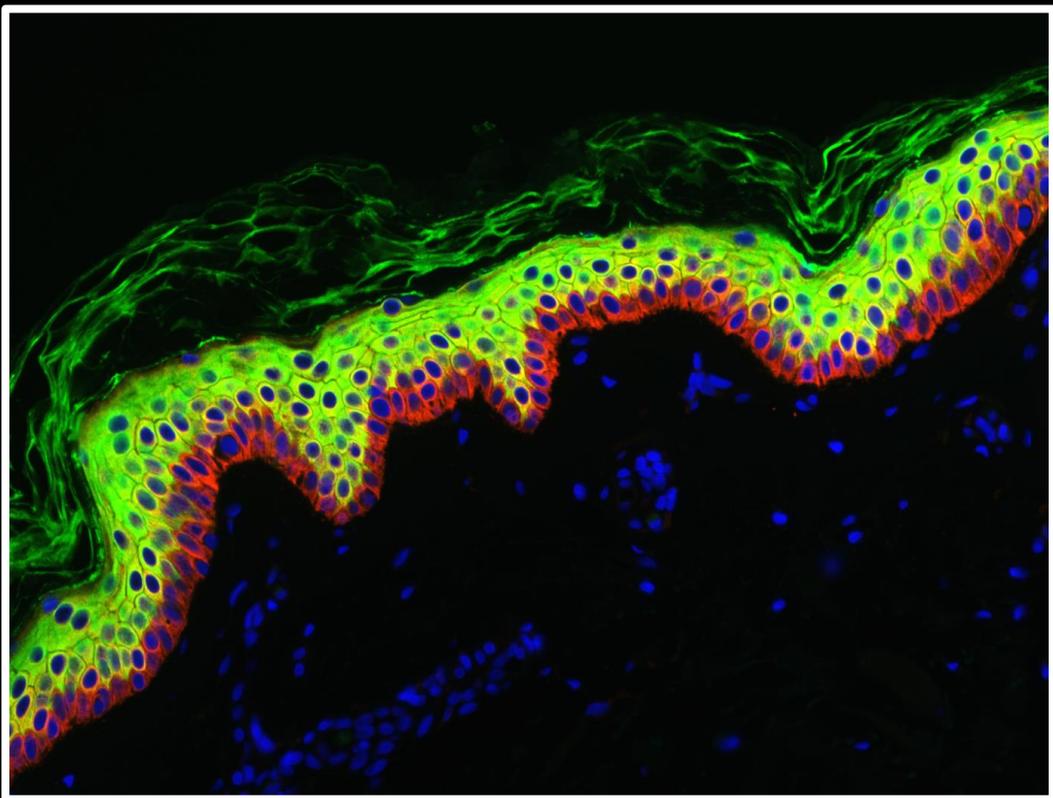


Células primarias de piel como modelo *in vitro* del Síndrome ADNP, una nueva variante del Espectro Autista



TESIS DOCTORAL

María del Pilar Mollinedo Sedano

Directores:

Dr. José Luis Fernández Luna
Dr. Alberto Gandarillas Solinis

Santander, 2018



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE BIOLOGÍA MOLECULAR



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
MARQUÉS DE VALDECILLA

Células primarias de piel como modelo *in vitro* del Síndrome ADNP, una nueva variante del Espectro Autista

TESIS DOCTORAL

María del Pilar Mollinedo Sedano

Directores:

Dr. José Luis Fernández Luna

Dr. Alberto Gandarillas Solinis

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

SANTANDER, 2018

Células primarias de piel como modelo *in vitro* del Síndrome ADNP, una nueva variante del Espectro Autista

DIRECTORES:

Dr. José Luis Fernández Luna

Dr. Alberto Gandarillas Solinis

Tesis Doctoral presentada por María del Pilar Mollinedo Sedano
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria

Santander, 2018



Dr. José Luis Fernández Luna, Coordinador de Genética del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla e Investigador Doctor principal del grupo Señalización Celular y Dianas Terapéuticas en Cáncer, del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL),

Dr. Alberto Gandarillas Solinis, Investigador Doctor principal del grupo Ciclo Celular, Células Madre y Cáncer del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL),

CERTIFICAN que D. ^a **María del Pilar Mollinedo Sedano**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “**Células primarias de piel como modelo *in vitro* del Síndrome ADNP, una nueva variante del Espectro Autista**”.

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en

Santander, 8 de Mayo de 2018

Fdo. Dr. José Luis Fernández Luna

Fdo. Dr. Alberto Gandarillas Solinis



Dr. José Luis Fernández Luna, Coordinador de Genética del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla e Investigador Doctor principal del grupo Señalización Celular y Dianas Terapéuticas en Cáncer, del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL)

EXPONE

Que ha llevado a cabo las funciones de **TUTOR** de la Licenciada en Biología D^a María del Pilar Mollinedo Sedano, durante todo el periodo de su programa de DOCTORADO en el Programa de Biología Molecular y Biomedicina. Durante este periodo ha desarrollado el proyecto de investigación que ha dado lugar a su trabajo de Tesis Doctoral titulado “**Células primarias de piel como modelo *in vitro* del Síndrome ADNP, una nueva variante del Espectro Autista**”, bajo la codirección del Dr. Alberto Gandarillas Solinis, Investigador Doctor principal del grupo Ciclo Celular, Células Madre y Cáncer del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), y de mí mismo.

Y para que conste y surta los efectos de admisión de la Tesis Doctoral, firmo la presente en

Santander, 8 de Mayo de 2018

Fdo. Dr. José Luis Fernández Luna

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la financiación de las siguientes instituciones:

- Fundación Instituto de Investigación Valdecilla (CI14/09)
- Instituto de Salud Carlos III (PI14/0900)

Agradecimientos

Cuando hace prácticamente 4 años el Dr. José Luis Fernández Luna y el Dr. Domingo González Lamuño me propusieron realizar un “pequeño estudio de la expresión de ciertos genes en una paciente de pediatría”, poco sospechábamos los tres el proyecto que se desarrollaría posteriormente, y que, finalmente, ha dado lugar a esta Tesis Doctoral. Y más lejos aún parecía el momento en el que habría que agradecer a todas y cada una de las personas que han estado a mi lado durante todo este tiempo, haciendo posible el desarrollo de este trabajo.

La norma dicta que, en primer lugar, se debe dar las gracias a los directores de la Tesis. Pero en esta ocasión, y si ellos me lo permiten, me gustaría empezar dando las gracias a tres personas sin las cuales, la realización y desarrollo de este trabajo habrían sido impensables. La primera de ellas, el Dr. Domingo González Lamuño. No eres solamente el pediatra que nos trajo el caso de una niña cuyo origen de su enfermedad era desconocido. Eres el responsable de contagiarnos la inquietud sobre su caso, de implicarnos hasta la médula en su historia. Gracias por no perder nunca la ilusión. Y personalmente, gracias por confiar en mi desde el principio. Gracias Domingo. En segundo lugar, me gustaría dar las gracias, gracias infinitas, a otra persona indispensable para el desarrollo de esta Tesis. Isabel, sin ti, ni siquiera podríamos haber empezado. Gracias por confiar ciegamente en nosotros. Gracias por ser una guerrera incansable e inconformista, una luchadora. Gracias por estar ahí cuando lo hemos necesitado. Gracias Isabel. La tercera persona a la que quiero dar las gracias, en realidad es una personita que ha ido creciendo mientras nosotros hacíamos crecer este trabajo. Gracias Marina, por haber formado parte de nuestras vidas durante estos años. Esta Tesis es por y para ti.

Gracias al Dr. José Luis Fernández Luna, por confiar en aquella cría que ni siquiera había acabado la carrera de Biología cuando contactó contigo. Por no haber perdido la confianza en mi después de estos años. Por darme la oportunidad de realizar esta Tesis. Gracias por enseñarme a investigar, por enseñarme y contagiarme tus ganas de hacer ciencia. Y gracias por la paciencia que has tenido conmigo estos años, y la que sigues teniendo. Gracias José Luis. Gracias al Dr. Alberto Gandarillas Solinis, por acogerme en tu laboratorio, por enseñarme y adentrarme en el mundo de la piel. Gracias por enseñarme a pensar y por tus consejos. Gracias Alberto.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular del Hospital Marqués de Valdecilla, a los que siguen al pie del cañón y a los ya os fuisteis. Por todos los momentos compartidos durante estos años, y por todo lo que me habéis enseñado todos. Gracias a Ana Fontalba y a Gema, por vuestra ayuda, por vuestros ánimos, por las risas compartidas. Gracias a Maribel, porque eres la caña y haces que la gente se ría hasta cuando esta triste. A Ana Talamillo, por tus consejos y enseñanzas. Gracias Ana T. Gracias a Alfredo y Fran, porque no sabéis lo que se os echa de menos a los chicos, siempre dispuestos a ayudar. Gracias a Eva, por ser como eres, por tener una

visión tan clara de las cosas. A Rebe, siempre resolutiva y dispuesta a ayudar con una cara amable, tanto en lo profesional como en lo personal. Eva y Rebe, muchas gracias chicas, porque habéis sido un gran apoyo en la recta final, por todo lo que nos hemos reído, porque no sois compañeras de laboratorio, sino que os habéis convertido en amigas. Gracias a Carlos, aquel residente de neurocirugía que empezó su andadura a la vez que yo en el laboratorio de Genética. Gracias por tus consejos y tu ayuda. Por último, y no menos importante, quiero dar las gracias a Olga. Ay Olgui...desde mis inicios ahí, enseñándome prácticamente todo lo que he aprendido en el laboratorio. Gracias por la paciencia que tuviste, y que tienes, por ayudarme, por ser una amiga, por estar ahí, siempre. Gracias por ser como eres. Gracias Olga.

También tengo que dar las gracias a mis compañeras de “mi otro laboratorio”. Ana Freije, Rut, Isa, Natalia y Laura. Aunque oficialmente no perteneciera a vuestro laboratorio, me hicisteis sentirme como una más. Gracias Ana, por tus enseñanzas y tus consejos, por acogerme como un polluelo más al que cuidar y enseñar. Rut, Isa y Natalia, gracias por el apoyo que me habéis mostrado este tiempo, por ayudarme y enseñarme. Muchas gracias chicas, no sabéis lo que os lo agradezco. Y gracias a Laura, por enseñarme al inicio de mi andadura en vuestro labo, pero además, gracias por los cafés, junto a Lara y Pilar. Por escuchar las penas y alegrías.

Gracias al Dr. Pedro J. Real Luna, por colaborar sin miramientos cuando te lo pedimos. Sin tu ayuda y la de la gente de tu laboratorio, este proyecto no habría sido lo mismo. Gracias a la Dra. Elena González Muñoz y a la Dra. Fuencisla Pilar Cuellar por vuestra colaboración desde el LARCEL y el IBBTEC, por prestaros a colaborar sin dudaros, y por vuestra amabilidad. Gracias a la Dra. Carmen González Vela, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla por tu ayuda y colaboración. Gracias al Dr. Fernando Moreno, al Dr. Francisco González, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Cantabria, junto con el Dr. Alfredo Franco, por vuestra gran amabilidad y por prestarnos vuestra ayuda y colaboración. También tengo que dar las gracias a la parte internacional de este proyecto. Gracias a la Dra. Illana Gozes y a Oxana Kapitansky, por vuestra implicación en el proyecto y por mostraros dispuestas desde un inicio a colaborar.

También quiero dar las gracias a mis evaluadores, el Dr. José Antonio Riancho y el Dr. Javier León. Gracias por seguir de cerca este trabajo, y por vuestros consejos y amabilidad durante las evaluaciones anuales.

Gracias también al Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla y al Instituto de Salud Carlos III por la ayuda económica sin la cual no se hubiera podido desarrollar este trabajo.

Me gustaría dar las gracias a esa gente que ha estado implicada en este trabajo, aunque quizá de una forma no tan directa. Gracias a Silvia Torices, porque no solo han sido las horas compartidas en el laboratorio, que han sido muchas, sino por las compartidas fuera de él. Gracias por tu alegría siempre incombustible. Gracias Silvia. Gracias a Lara, porque no solo me enseñaste a trabajar en un laboratorio, sino que

enseñaste cosas más importantes en la vida, haciéndome ver que salir del círculo de confort, quizá no sea tan malo. Gracias por tus ánimos, por las risas, por estar en las buenas y en las malas. Gracias Lara. Gracias a Sara, la valiente estudiante de máster. A ti te tengo que agradecer tu amistad, los cafés al sol. Yo solo puedo quitarme el sombrero ante ti, porque vales mucho y tienes todos mis respetos. Gracias Saruca. También le quiero dar las gracias a Flori, una enfermera que siempre te recibe con una sonrisa. Gracias por tu ayuda cuando la he necesitado. Muchas gracias Flori.

Fuera del ámbito laboral, me gustaría dar las gracias a otra parte importante de esta Tesis, mis amigos y familiares.

Gracias a Silvia, Isa, Gema, Javi, Silvia (Lola), Dani, Manu, Sara y Carmen. Gracias por todo, por ser todos como sois, porque hablar con vosotros son risas garantizadas. Porque nos juntamos poco, pero cuando nos juntamos...madre mía. En especial gracias a Silvia, Isa y Gema, fieles escuderas. Vosotras habéis sufrido y aguantado como nadie las penas y alegrías no solo de esta Tesis, sino las personales también. Muchísimas gracias, porque con vosotros, la palabra amigos, se queda pequeña.

Gracias también a ese otro grupo de gente a la que llegué como “arrimada de”: Juan, Raquel, Ángel, Zuleica, Javi (Cagi), Patri, Diego, Tania, Nando, Alicia y Javi (Minche). Gracias por acogerme como una más y por ser como sois chicos.

Gracias a Ani y a Antonio, por acogerme como una más de vuestra familia, por preocuparos por mí. No sabéis lo agradecida que estoy y lo afortunada que me siento por haberos conocido y de que seáis los padres de Antonio.

Y hablando del rey de Roma...Gracias Antonio. No sé por dónde empezar a agradecerte cosas. La primera y más importante, gracias por estar en mi vida, por aparecer en el momento adecuado. Te ha tocado vivir junto a mí los momentos más difíciles. Gracias por ser un apoyo, primero en lo personal, y segundo, en lo profesional. Gracias por querer formar parte de vida, por quererme, aguantarme y entenderme. Gracias Antonio.

Por último, me gustaría darles las gracias a mis padres. Gracias a mi madre, porque en estos años nos has enseñado la mejor de las lecciones que se pueden enseñar en esta vida, la de luchar contra viento y marea y no rendirse nunca, por malas que sean las circunstancias y las complicaciones que se presenten. Gracias mamá. Gracias a mi padre, porque hablar contigo me proporciona una gran tranquilidad, pese a lo grande que sea el problema, haciendo que estos sean más pequeños. Porque siempre tienes una solución para todo, por mantener la calma e inundar con esa calma a los demás. Gracias papá. Gracias a los dos por todo, por haberme educado y enseñado como lo habéis hecho. Por permitirme ir a otra a ciudad a estudiar lo que me gustaba, con el esfuerzo que ha conllevado, sin un reproche nunca durante todos estos años, pese al mal humor y las malas caras cuando un examen o un experimento no salía bien... Si he realizado esta Tesis, ha sido principalmente gracias a vosotros, a vuestro apoyo, a vuestros ánimos y a vuestro cariño. Esta Tesis no es sólo mía, es también vuestra. Gracias.

A mis padres

A Antonio

ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS	1
1.- INTRODUCCIÓN	5
1.1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA PACIENTE	5
1.1.1.- Historia Clínica	5
1.2.- PROTEÍNA NEUROPROTECTORA DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD: ADNP	7
1.2.1.- Descubrimiento y estructura de ADNP	7
1.2.2.- Funciones de ADNP	9
1.2.2.1.- ADNP y su efecto neuroprotector	9
1.2.2.2.- ADNP y desarrollo embrionario	9
1.2.3.- Regulación de <i>ADNP</i> por el péptido intestinal vasoactivo (VIP)	11
1.2.4.- Distribución celular de la proteína ADNP	11
1.2.5.- Significado fisiológico de ADNP: Genes diana de ADNP	12
1.2.6.- Interacción de ADNP con la proteína heterocromatina 1 α (HP1 α)	14
1.2.7.- ADNP y el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF	14
1.3.- PÉPTIDO NAP	15
1.3.1.- Desarrollo de un agente como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas (ejemplo de la enfermedad de Alzheimer)	16
1.3.2.- Mecanismo de acción del péptido NAP	19
1.3.3.- Características moleculares del péptido NAP	21
1.4.- SÍNDROME ADNP	22
1.4.1.- Identificación de mutaciones en ADNP en pacientes con Autismo	23
1.4.2.- Mecanismo mutacional del gen <i>ADNP</i>	24
1.4.3.- Características clínicas del Síndrome ADNP	25
1.5.- MODELO CELULAR DE PIEL	26
1.5.1.- Estructura y organización de la piel	26

1.5.2.- Proceso de diferenciación terminal de queratinocitos	28
1.5.3.- Ciclo celular de los queratinocitos	29
1.5.3.1.- Ciclo celular de queratinocitos proliferativos	29
1.5.3.2.- Ciclo celular de queratinocitos en proceso de diferenciación	30
1.6.- MODELO CELULAR BASADO EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS	32
1.6.1.- Definición y propiedades	32
1.6.2.- La reprogramación de diferentes linajes celulares hacia células pluripotentes inducidas (iPSCs) usando factores de transcripción específicos	33
1.6.3.- Fases de la reprogramación hacia iPSCs	34
2.- OBJETIVOS	35
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1.- CULTIVO CELULAR	41
3.1.1.- Muestras biológicas	41
3.1.2.- Aislamiento de queratinocitos de piel y fibroblastos	41
3.1.3.- Crecimiento, mantenimiento y expansión de cultivos celulares de queratinocitos de piel	42
3.1.4.- Crecimiento, mantenimiento y expansión de cultivos celulares de fibroblastos	44
3.1.5.- Generación de células madre pluripotentes inducidas (<i>induced Pluripotent Stem Cells</i> , iPSCs)	44
3.1.6.- Crioconservación de las células	45
3.1.7.- Tratamiento con NAP	45
3.2. TÉCNICAS MOLECULARES	45
3.2.1.- Extracción de ARN total	45
3.2.2.- RT-PCR Semicuantitativa	46
3.2.3.- RT-PCR Cuantitativa	47
3.2.4.- Oligonucleótidos	47
3.3.- TÉCNICAS CELULARES	48
3.3.1.- Citometría de flujo	48
3.3.1.1.- Expresión de marcadores de diferenciación en queratinocitos	48

3.3.1.2.- Análisis de apoptosis mediante detección de Anexina V	49
3.3.2.- Ensayo de clonogenicidad	50
3.3.3.- Ensayos de proliferación celular	51
3.3.4.- Inmunofluorescencia	51
3.3.4.1.- Inmunofluorescencia en células	51
3.3.4.2.- Inmunofluorescencia en parafina	52
3.4.- ESTUDIOS CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	53
3.4.1.- Modelo animal para el estudio de piel	53
3.4.1.1.- Administración y tratamiento con el péptido NAP al modelo de ratón transgénico	53
3.4.1.2.- Establecimiento del modelo celular de fibroblastos a partir de ratones transgénicos y tratamiento con NAP	53
3.4.1.3.- Inmunofluorescencia en secciones de piel procedentes del modelo de ratón transgénico	54
3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
4.- RESULTADOS	57
4.1.- ESTUDIO GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD	59
4.1.1.- Estudios moleculares	59
4.1.2.- Secuenciación del exoma Trio	61
4.2.- ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO CELULAR PRIMARIO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS GENÉTICOS Y CELULARES	62
4.2.1.- Las células portadoras de la mutación en el gen <i>ADNP</i> presentan diferencias morfológicas y una menor capacidad proliferativa respecto a las células sin mutación	63
4.2.2.- Los queratinocitos de piel portadores de la mutación en el gen <i>ADNP</i> presentan una mayor diferenciación terminal escamosa	66
4.3.- ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LA PIEL DE LA PACIENTE A PARTIR DE LA BIOPSIA DE PIEL	67
4.3.1.- En secciones de piel procedentes de la paciente, encontramos una menor proliferación celular junto con una mayor diferenciación	67
4.3.2.- La piel procedente de la paciente portadora de la mutación en el gen <i>ADNP</i> presenta diferencias en la expresión de las proteínas del ciclo celular de queratinocitos	70

4.4. DESARROLLO DE UNA POSIBLE ESTRATEGÍA TERAPÉUTICA PARA CORREGIR LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA MUTACIÓN EN <i>ADNP</i>	74
4.4.1.- El péptido NAP incrementa de forma tendencial la capacidad proliferativa de queratinocitos y fibroblastos <i>in vitro</i>	74
4.4.2.- El péptido NAP disminuye la diferenciación terminal en queratinocitos	77
4.5.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL EN UN MODELO DE RATÓN EN HEMICIGOSIS PARA <i>Adnp</i>	81
4.5.1.- Las células de la piel de los ratones que expresan <i>Adnp</i> en hemicigosis presentan una menor capacidad proliferativa que puede ser corregida mediante el tratamiento con el péptido NAP	81
4.5.2.- El péptido NAP disminuye la diferenciación en el modelo de ratón transgénico <i>in vivo</i>	82
4.6.- ESTABLECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPSCs) COMO MODELO CELULAR PARA EL ESTUDIO DEL SÍNDROME ADNP	84
4.6.1.- Obtención y caracterización de células madre pluripotentes inducidas a partir de linfocitos	85
4.6.2.- Diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas obtenidas hacia neuronas	87
5.- DISCUSIÓN	88
5.1. Estudio genético	90
5.2.- Efectos de la mutación en <i>ADNP</i> sobre las funciones celulares	91
5.3.- Posible mecanismo de acción de <i>ADNP</i> sobre el ciclo celular	93
5.4.- Efecto del tratamiento con el péptido NAP y posible mecanismo de acción	95
5.5.- Desarrollo de un modelo celular basado en la reprogramación para el estudio del Síndrome <i>ADNP</i>	99
6.- CONCLUSIONES	102
7.- BIBLIOGRAFÍA	106

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

7-AAD: 7-amino-actinomycin D

ADN: Ácido desoxirribonucleótido

ADNc: ADN complementario

ADNP: Proteína neuroprotectora dependiente de actividad

AIRE: autoimmune regulator

APECED: Poliendocrinopatía autoinmune tipo 1

ApoE: Apolipoprotein E

ARN: Ácido ribonucleótido

B

BAF: Factores asociados a BRG1

BSA: Seroalbúmina bovina

C

C2: Complemento C2

CCNA1: Ciclina A1

CCNB1: Ciclina B1

CCNE: Ciclina E

CFB: Complement Factor B

COL6A1: Colágeno 6 alfa 1

COL6A2: Colágeno 6 alfa 2

COL18A1: Colágeno 18 alfa-1

CYP2B6: Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B Member 6

D

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: Dimetil sulfóxido

E

EBs: Proteínas de unión a los microtúbulos

EDTA: Ácido etilengliocoltetracético

EGF: Epidermal growth factor

ERBB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2

F

FBS: Suero bovino fetal

FOXP1: Forkhead Box G1

H

H2AX H2A Histone Family Member X

H/E: hematoxilina/eosina

HP1 α : Proteína heterocromatina 1 α

HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

I

IGF-1: Insulin like growth factor 1

iPSCs: Induced pluripotent stem cells

ITGB2: Integrin beta 2

IVL: Involucrina

K

Ki67: Marcador de proliferación Ki67

KRT1: Queratina 1

KRT10: Queratina 10

L

LINC00315: Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 315

M

MECP2: Methyl-CpG Binding Protein 2

Mut: Mutado

N

NGF: Nerve Growth Factor

nM: nanomolar

NOTCH4: Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 4

O

OMS: Organización mundial de la salud

P

PACAP: Polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH3: Fosfo-histona H3

PRSS56: Protease, Serine 56

Q

qPCR: PCR cuantitativa

T

TEA: Trastorno del espectro autista

U

u.a: unidades arbitrarias

V

VPAC1: Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1

VPAC2: Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 2

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

W

Wt: Wild type

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Características clínicas de la paciente

1.1.1.- Historia clínica

La paciente es una niña seguida desde los primeros meses de vida en el servicio de pediatría del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander. En la actualidad tiene 12 años de edad. Los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral comenzaron cuando la paciente contaba con 7 años de edad. Hasta ese momento, se habían realizado diversos estudios y pruebas clínicas para tratar de aportar luz a la posible causa que producía el fenotipo conductual del espectro autista, junto al resto de manifestaciones clínicas de la paciente.

Desde los primeros meses de vida, la paciente manifestó un retraso generalizado del desarrollo de todas las áreas del desarrollo y leves alteraciones conductuales y estereotipias, todo esto dentro del contexto de un trastorno cognitivo moderado. Inicialmente, a pesar de no identificarse regresiones, se etiquetó como Síndrome de Rett atípico o un trastorno del espectro autista (TEA) en el Hospital San Juan de Dios de Barcelona. Además de estas manifestaciones, también ha presentado hiperlaxitud e hipotonía muscular, con un aspecto miopático más evidente en la cintura y extremidades inferiores. Inició la deambulación a la edad de cuatro años, con marcha torpe y amplia base de sustentación. En la actualidad camina con una rotación externa de caderas y pies con una “marcha de pato” característica. No presenta dismorfias ni rasgos sindrómicos significativos, salvo una “cara de muñeca” con frente prominente y una línea alta del pelo a nivel frontal. Tiene una piel fina e hiperqueratósica en rodillas y codos. Desde los 2 años de edad posee un peso y una talla por debajo del percentil 3, con escasa velocidad de crecimiento. Actualmente, la edad ósea está retrasada 2 años, con un desarrollo puberal infantil (Tanner 0). Presenta intolerancias digestivas y episodios de candidiasis y parásitos intestinales desde el nacimiento. Estas infecciones se han manifestado con cuadros digestivos disfuncionales y diarreas, junto con alteraciones endocrinas en diferentes sistemas (mineralocorticoides, tiroides, hormona de crecimiento). Desde el punto de vista metabólico, ha presentado episodios de hipoglucemias recurrentes, poliuria y cambios significativos en el comportamiento y en las capacidades motoras de nuestra paciente.

A lo largo de estos años hasta la actualidad, se ha llevado a cabo una estrecha vigilancia por parte de su pediatra. Las infecciones e infestaciones intestinales recurrentes han sido tratadas en cada ocasión. También se ha llevado a cabo un tratamiento mantenido con hormona del crecimiento (GH) e hidrocortisona oral a dosis mínimas que han permitido un adecuado control clínico de la paciente, mejorando la homeostasis glucídica y produciendo la desaparición de los episodios poliúricos. Todo este proceso ha desembocado en una mejora significativa de la paciente en todas las

esferas del desarrollo, con un lenguaje aceptable. Puntualmente presenta estereotipias características de los TEA.

Un tratamiento con la hormona del crecimiento se inició cuando la paciente contaba con 5 años de edad. Tras varios años con este tratamiento, se suspendió temporalmente, produciéndose un empeoramiento clínico que conllevó a la reaparición de los episodios de hipoglucemia.

En el contexto de su TEA, durante todo el seguimiento se realizaron diferentes estudios de imagen cerebral y de electroencefalografía (EEG) que no mostraron alteraciones significativas. Tal y como se ha comentado previamente y con el objetivo de descartar el síndrome de Rett se solicitó al Servicio de Genética del HUMV un estudio genético de las variantes típica y atípica de los genes *MECP2* y *FOXG1*. El resultado de este estudio fue negativo para mutaciones en ambas variantes.

Durante los primeros meses de vida, nuestra paciente manifestó una disfunción intestinal intermitente muy significativa. Esta disfunción intestinal se manifestó mediante intolerancias alimentarias cambiantes, cuadros de dispepsia y disbiosis intestinal con diarrea crónica inespecífica, junto con distensión abdominal. Mediante dieta semielemental, antibioterapia y antifúngicos se consiguió una respuesta transitoria frente a estos cuadros digestivos. Durante toda su vida ha presentado parasitosis intestinales frecuentes, siendo las más recurrentes las producidas por giardia, áscaris y por oxiuros. Se le realizó una video-endoscopia con cápsula endoscópica mediante la que se confirmó una enfermedad inflamatoria intestinal difusa con candidiasis a lo largo de todo el intestino. Además, de forma recurrente se aísla *Candida sp.* a nivel intestinal. Sin embargo y hasta el momento, la paciente no ha presentado candidiasis sistémica ni cutánea.

En lo referente al metabolismo, nuestra paciente ha presentado alteraciones en la homeostasis energética, con episodios de hipo-hiperglucemia que no estaban relacionados con la ingesta o con el ayuno. Además, estos episodios fueron acompañados de cetosis. De forma puntual ha presentado hipoglucemias significativas de menos de 40 mg/dl, e hiperglucemias de hasta 330 mg/dl. Se descartaron todas las posibles alteraciones en el metabolismo intermediario, que incluyeron estudios de neoglucogénesis, glucogenólisis, cetólisis, y de beta oxidación de los ácidos grasos. Además, también se estudiaron los ejes hormonales implicados en el metabolismo energético, objetivando que los niveles del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) estaban disminuidos de forma continuada. También se observó una respuesta pobre en la concentración plasmática de cortisol (cortisolemia) dentro del contexto de las hipoglucemias con una respuesta normal respecto a la secreción de insulina. No se identificaron déficits en la secreción de hormona del crecimiento (GH) ni de cortisol a niveles basales. Ocasionalmente, se han producido episodios de poliuria con una escasa capacidad de concentración urinaria junto con una osmolaridad plasmática elevada. Esto se interpretó como una deficiencia mineralocorticoidea, aunque no se encontraron alteraciones plasmáticas de aldosterona.

La normalización intestinal mediante el tratamiento periódico con antibióticos, antifúngicos y antiparásitos, desaparecieron la disbiosis, la candidiasis y la parasitosis intestinal, acompañada de una marcada mejoría en el comportamiento y en las capacidades motoras de la paciente.

Teniendo en cuenta la disfunción en la homeostasis energética con la tendencia a hipoglucemias graves debidas a la disminución de los niveles de IGF-1, y la respuesta pobre de la hormona de crecimiento y del cortisol durante estos episodios, se inició un tratamiento compasivo compuesto por la administración de la hormona del crecimiento, hidrocortisona y fludicortisona. Se observaron resultados positivos respecto al control del metabolismo glucémico y la capacidad de concentración urinaria. Además de esta mejoría metabólica, también se observó un aumento de la fuerza y el tono muscular junto con una mejoría en todas las esferas del desarrollo psicomotor de la paciente. Finalmente, y como hecho destacable en su desarrollo, tras iniciar el tratamiento con la hormona del crecimiento, la paciente consiguió caminar a los 5 años de edad.

Además de los tratamientos arriba descritos con los que se han obtenido resultados positivos, también se han probado diferentes estrategias terapéuticas. Estos otros tratamientos se basaron en el aporte de co-factores a grandes dosis y tratamientos homeopáticos relacionados con la inmunodeficiencia sin obtener resultados objetivos.

1.2.- Proteína Neuroprotectora Dependiente de Actividad: ADNP

1.2.1.- Descubrimiento y estructura de ADNP

El gen *ADNP* se identificó como un gen de respuesta al péptido intestinal vasoactivo (VIP) durante el desarrollo postnatal del cerebro (Bassan et al., 1999). VIP afecta al desarrollo y funciones del cerebro (Gozes et al., 1993; Gressens et al., 1994; Walther & Gruss, 1991). La expresión de VIP incrementa con la maduración del cerebro (Gozes et al., 1993) estimulando la formación de sinapsis (Blondel et al., 2000) y esta expresión disminuye con la edad. El gen *Adnp* fue clonado a partir de las células diferenciadas de carcinoma de ratón P19. Estas células, en presencia de ácido retinoico, son capaces de diferenciarse hacia células de la neuroglia (Bassan et al., 1999). De forma paralela, a partir de una librería de ADN complementario obtenido a partir de cerebro fetal humano, se clonó el gen *ADNP* humano (Zamostiano et al., 2001). Al comparar la secuencia de ambos ortólogos, el gen aislado a partir de células de ratón, y el gen aislado a partir de células humanas, se descubrió que a nivel de ARN mensajero existe una identidad entre ambos del 90%. Este dato demuestra que se trata de un gen altamente conservado a lo largo de la evolución. Además, este gen se expresa de forma abundante en el cerebro y en todo el organismo en general (Bassan et al., 1999; Wu et al., 1997). Se han encontrado niveles de expresión de *ADNP* en forma de ARN mensajero en el hipocampo (Bassan et al., 1999), en el córtex cerebral (Bassan et al., 1999; Wu et al.,

1997) y en el cerebelo (Wu et al., 1997), lo cual sugiere una implicación de la proteína en el metabolismo del cerebro.

El gen *ADNP* posee un tamaño de 40 kilobases. Está formado por 5 exones y 4 intrones, y presenta procesamiento alternativo en el segundo exón. Mediante técnicas de mapeo genómico, se sabe que este gen se localiza en el cromosoma 20, concretamente en la posición 20q12-13.2. También se ha encontrado que los principales dominios funcionales de la proteína se encuentran codificados en el exón 5 (Figura I.1).

La proteína recibe el mismo nombre del gen, ADNP. Dicha proteína tiene un peso de 123562,8 Da. Su estructura (Figura I.1) está constituida por 9 dedos de zinc, una región rica en prolina, una señal de localización nuclear bipartida y señales celulares de importación y exportación al núcleo junto con un dominio homeobox. Por estas razones se ha definido a ADNP como un factor de transcripción que desarrolla múltiples funciones celulares tanto a nivel citoplasmático como a nivel extracelular (Gozes, Zamostiano, Pinhasov, Bassan, & Giladi, 2000; Wu et al., 1997). También encontramos una secuencia de unión con la proteína heterocromatina 1 α (HP1 α), lo que sugiere la interacción entre ADNP y HP1 α , por lo que ADNP desarrollaría una función en la regulación de la heterocromatina (como veremos más adelante). Además de estos dominios funcionales, también encontramos el dominio NAP, que consiste en un octapéptido que posee función neuroprotectora, como se explicara más adelante.

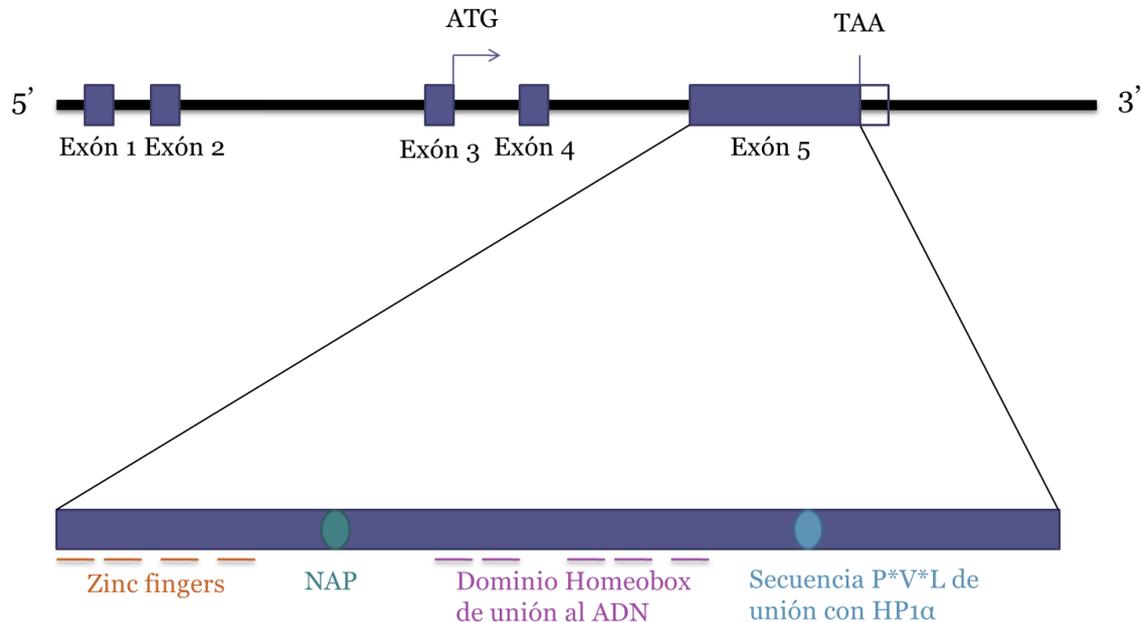


Figura I.1.- Estructura del gen *ADNP*. En esta imagen se pueden observar los cinco exones que componen el gen *ADNP*. En el esquema vemos que en el exón 5 es donde se encuentran codificados los principales dominios funcionales de la proteína ADNP.

1.2.2- Funciones de ADNP

1.2.2.1.- ADNP y su efecto neuroprotector

Las células que sobreexpresan ADNP, presentan una protección frente a daños producidos por diferentes agentes que conllevan a la producción de estrés celular. Algunos de estos daños son la toxicidad debida a la exposición al péptido β -amiloide o al daño producido por el estrés oxidativo (H_2O_2) (Steingart & Gozes, 2006).

Además, cuando las células son expuestas a alguno de estos agentes tóxicos, se ha encontrado un incremento de expresión de la proteína proapoptótica p53. Pero, curiosamente, si se exponen a estos agentes células que sobreexpresan ADNP, los niveles de p53 se reducen de forma significativa. De esta forma, un incremento en la expresión de ADNP conlleva un descenso de la expresión de p53.

Cuando se exponen células postmitóticas como las neuronas, a un ambiente de estrés o perjudicial, se produce un incremento de p53, y, por consiguiente, un incremento de la mortalidad celular. Pero si estas células postmitóticas sobreexpresan ADNP, se produce una reducción de la mortalidad celular (Gozes, 2007). Con estos datos se ha podido corroborar que un análogo de VIP proporciona protección a las células frente a daños producidos por estrés oxidativo, induciendo de forma paralela un incremento en la expresión de ADNP.

1.2.2.2.- ADNP y desarrollo embrionario

Para poder estudiar la función de ADNP *in vivo* durante el desarrollo embrionario, se han desarrollado ratones knockout para *Adnp* (Pinhasov et al., 2003). En ratones se ha observado que el ARN mensajero de *Adnp* se expresa durante una fase temprana de la gestación, concretamente en el estadio E7,5, pasando a ser máxima esta expresión en el estadio E9,5. Este incremento de expresión en el día 9 del desarrollo embrionario coincide con el cierre del tubo neural. Posteriormente, en estadios tardíos del desarrollo embrionario hasta el nacimiento, se produce una reducción de los transcritos de *Adnp*. Sin embargo, en el cerebro embrionario, no se produce esta disminución de la expresión del gen, sino que la expresión se mantiene en este órgano. Por tanto, la expresión del gen *Adnp* implica un papel de la proteína homónima durante el desarrollo embrionario (Pinhasov et al., 2003).

Durante la embriogénesis en ratones, entre los estadios E8,5 y E10,5 del desarrollo embrionario y coincidiendo con el pico de expresión de *Adnp*, se producen una serie de eventos importantes del desarrollo entre los que se incluyen (Greene et al., 2002):

- 1.- La formación del tubo neural, el primordio del sistema nervioso central. Este proceso se inicia en el límite entre la zona cervical y la parte posterior del cerebro (metencéfalo y rombencéfalo), y finaliza con el cierre del neuróporo.

- 2.- Se produce la rotación axial.

- 3.- Formación de las somitas diferenciadas.

4.- Remodelación del corazón con el inicio de las contracciones regulares.

5.- Desarrollo de la placenta corioalantoidea.

Para la obtención de ratones knockout, se han generado ratones heterocigotos que han sido cruzados con los ratones con genotipo normal (wild type). Al realizar los cruces, la progenie esperada debería cumplir el ratio típico de la segregación mendeliana (1:2:1). Sin embargo, al nacer, los genotipos de los ratones mostraban un ratio 1:2:0, lo cual indica que *Adnp* es un gen vital, esencial para la supervivencia. Al analizar los ratones knockout generados, se descubrió que los ratones knockout morían durante el desarrollo embrionario debido a un fallo en el cierre del tubo neural (Figura I.2). Concretamente, este proceso tiene lugar en ratones durante los estadios E8,5 – E9,5 del desarrollo embrionario (como se ha mencionado anteriormente). Entre estos estadios es cuando se producen las diferencias fenotípicas entre los knockout y los wild type, y estas diferencias son altamente significativas. En los embriones knockout para *Adnp* se manifiesta un retraso en el desarrollo embrionario: en el estadio E9,0 presentan un fenotipo correspondiente al estadio E8,0. Finalmente, en estos ratones se observa una inhibición de la formación del cerebro entre los estadios E8,0 y E9,5 que culmina con la total desintegración del desarrollo de los embriones knockout (Gozes, 2007; Pinhasov et al., 2003).

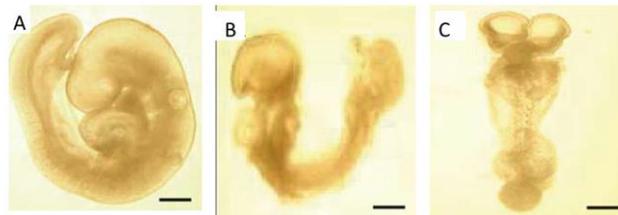


Figura I.2.- Diferencias morfológicas entre embriones wild type y knockout para *Adnp*. En la imagen A se puede observar la morfología de un embrión wild type en vista lateral. En las imágenes B y C se puede observar la morfología de un embrión knockout para *Adnp*. En la imagen B se observa en vista lateral y en la imagen C se observa en vista ventral. Ambos embriones, wild type y knockout, se encuentran en el estadio E9,5 del desarrollo embrionario. Imagen tomada de Pinhasov et al., 2003.

En los ratones knockout para *Adnp* se ha estudiado la expresión de dos genes implicados en desarrollo: *Oct4* y *Pax6*. *Oct4* es un marcador del epiblasto indiferenciado. Este gen es un miembro de la familia de factores de transcripción que poseen el dominio POU y su papel esencial es el mantenimiento de las células madre embrionarias y el establecimiento del linaje de las células germinales. La expresión de *Oct4* disminuye durante la gastrulación, cuando las células madre se diferencian. *Pax6* es un gen crucial para la formación del córtex cerebral, y al contrario que *Oct4*, se expresa de forma tardía durante el desarrollo embrionario, siendo detectado, como pronto, durante el estadio E8,0 del desarrollo embrionario. Se ha visto que la expresión de *Oct4* se encuentra disminuida en los estadios E8,0-E8,5 en ratones wild type para *Adnp*. Sin embargo, en

los ratones knockout para *Adnp* se ha visto que la expresión de *Oct4* esta incrementada durante el mismo estadio del desarrollo embrionario. Por el contrario, la expresión de *Pax6* es nula en el primordio del tejido cerebral de estos embriones knockout para *Adnp*. De esto se deduce que *Oct4* y *Pax6* constituyen una parte del mecanismo de acción de *Adnp* en la formación del cerebro, de forma que inhibe la división de la línea germinal y favorece la activación de la morfogénesis. De esta forma, se puede decir que *Adnp* es un gen esencial para la organogénesis durante el desarrollo embrionario (Gozes, 2007; Pinhasov et al., 2003).

1.2.3.- Regulación de ADNP por el péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Cuando se exponen células de la astrogía durante un corto periodo de tiempo al neuropéptido VIP, el contenido de ARN mensajero de *ADNP* aumenta, siendo entre 2 y 3 veces mayor esta expresión (Bassan et al., 1999). Este incremento de expresión es dependiente de la edad de los astrocitos (Zusev & Gozes, 2004). Las señales de VIP se transmiten a través de la interacción con receptores acoplados a la proteína G. Estos receptores reciben el nombre de VPAC1, VPAC2 y PAC1. El polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), es un neuropéptido que presenta una gran homología con VIP, por lo que es capaz de interactuar con los receptores arriba mencionados. De esta forma, PACAP también es capaz de regular la expresión de *ADNP* (Zusev & Gozes, 2004). Esto se produce a través de varios receptores de VIP, entre los que estarían incluidos VPAC2 (Quintana et al., 2006; Zusev & Gozes, 2004), PAC1 y VPAC1, en función de la célula sobre la que se vaya a actuar (Quintana et al., 2006; Zusev & Gozes, 2004). Las actividades de VIP y PACAP dependen de la expresión de sus receptores sobre la membrana celular de las células diana.

Debido a esta regulación, se ha sugerido que VIP posee un papel como factor de crecimiento durante la embriogénesis de ratones. Mediante la incubación de embriones de ratón con VIP, se observó un mayor crecimiento, incluyendo también un mayor número de somitas, un mayor volumen embrionario, un mayor contenido de ADN y proteínas y un mayor número de células en fase S del ciclo celular (Gressens, Hill, Gozes, Fridkin, & Brenneman, 1993). Estos datos, junto al incremento de expresión de *ADNP* tras la incubación con VIP, sugirieron que el gen *ADNP* posee un papel vital en la maduración del cerebro, la cual esta mediada por un crecimiento embrionario estimulado por VIP (Pinhasov et al., 2003).

1.2.4.- Distribución celular de la proteína ADNP

El tipo celular en el cual se ha estudiado más tanto la función como la distribución de *ADNP* son las células de la glía, concretamente, en astrocitos. La proteína *ADNP* se localiza en el citoplasma y en el núcleo de los astrocitos. En el núcleo, la estructura primaria de la proteína *ADNP* contiene motivos en su secuencia que sugieren una actividad como factor de transcripción. En el citoplasma, *ADNP* co-localiza con la

tubulina y los microtúbulos, pero no con los microfilamentos de actina. Dado que los microtúbulos son componentes clave de las neuronas y del cerebro en general, la interacción entre ADNP y la tubulina sugiere una correlación funcional de ADNP en el cerebro (Furman et al., 2004).

También se ha detectado la presencia de ADNP en el medio extracelular de astrocitos, y además, la cantidad detectada aumenta cuando estas células están en presencia de VIP, al igual que se ha mencionado anteriormente con los niveles de ARN mensajero (Furman et al., 2004). Se sabe que VIP activa los astrocitos para que estos secreten factores neuroprotectores/neurotróficos, de forma que ADNP forma parte de esta vía de protección estimulada por VIP. Además, la proteína ADNP presenta un homeodominio muy similar al dominio homeobox de la familia de proteínas HOX. Las proteínas HOX son factores de unión al ADN que están involucrados en la regulación transcripcional de procesos clave del desarrollo (Castelli-Gair Hombria & Lovegrove, 2003). Este homeodominio contiene una señal de exportación nuclear conservada y una señal de localización nuclear (Furman et al., 2004; Gozes, Giladi, Pinhasov, Bardea, & Breneman, 2000; Gozes, Zamostiano, et al., 2000). El perfil de homeodominio de ADNP incluye una secuencia rica en leucinas que es homóloga a otras secuencias encontradas en otros homeodominios (Gozes, Zamostiano, et al., 2000). Esta secuencia rica en leucinas es necesaria para la secreción de la proteína y para su exportación al núcleo. También se ha encontrado una homología entre la secuencia de importación citoplasmática y ADNP. Esta secuencia encontrada en el homeodominio de la proteína es importante para la internalización de la proteína en las células. Además, la proteína ADNP debe ser internalizada por otras células, como las neuronas, después de ser secretada por las células de la glía (Furman et al., 2004).

1.2.5.- Significado fisiológico de ADNP: Genes diana de ADNP

Para la identificación de genes diana sobre los que actúa ADNP, se han realizado estudios utilizando ratones knockout, ratones con fenotipo control (wild type) y ratones heterocigotos para la expresión de *Adnp*. Concretamente, se utilizaron embriones que se encontraban en el estadio E9,0 del desarrollo embrionario, ya que como ya se ha mencionado, es cuando comienzan a apreciarse las diferencias morfológicas y el retraso en el desarrollo embrionario antes de producirse el aborto. Se encontraron 469 genes cuya expresión se encuentra alterada en los ratones knockout para *Adnp*. De los 469 genes, la expresión de 248 es mayor si se compara con los controles, mientras que la expresión de 221 genes es menor (Mandel, Rechavi, & Gozes, 2007).

Mediante posteriores análisis funcionales, se ha dilucidado y dividido por bloques funcionales los genes cuya expresión incrementa y aquellos bloques funcionales de genes cuya expresión disminuye (Figura 1.3) (Mandel et al., 2007):

1.- Genes cuya expresión disminuye:

1.1.- Genes reguladores de la transcripción: genes asociados con algún proceso que regula la frecuencia, la velocidad o cantidad de síntesis de ARN.

1.2.- Organogénesis: Genes relacionados con la determinación de la morfogénesis de un tejido o de diferentes tejidos que trabajan juntos para llevar a cabo una función específica.

1.3.- Neurogénesis: Genes relacionados con el origen y la formación del tejido nervioso.

2.- Genes cuya expresión aumenta:

2.1.- Transporte de lípidos: proteínas asociadas con el transporte de lípidos al interior o exterior de la célula, o entre las células.

2.2.- Vacuolas líticas: mantenimiento de vacuolas con un pH ácido que contiene enzimas para la degradación, incluyendo una gran variedad de hidrolasas ácidas.

2.3.- Coagulación: algunos procesos que regulan la frecuencia, ratio o grado de coagulación sanguínea, incluyendo proteasas o antiproteasas asociadas a la embriogénesis.

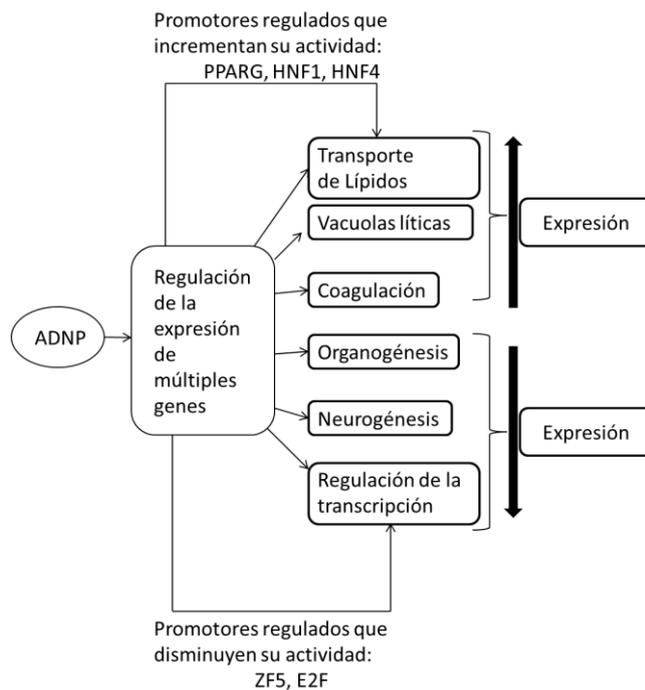


Figura I.3.- Esquema que resume las diferentes rutas reguladas por *Adnp*. En el esquema se pueden observar las familias de genes cuya expresión aumenta o disminuye en embriones knockout homocigotos para *Adnp*, así como la acción sobre diferentes promotores. Modificado de Mandel et al., 2007.

Por tanto, estos genes cuya expresión aumenta o disminuye según la expresión o no expresión de *Adnp*, se consideran genes diana de ADNP. Además, en las células neuronales diferenciadas existe una interacción entre ADNP y la cromatina. Esta interacción incluye los promotores de estos genes cuya expresión varía entre embriones knockout y embriones control. Sin embargo, esta interacción no se produce en células neuronales no diferenciadas (Mandel et al., 2007).

1.2.6.- Interacción de ADNP con la proteína heterocromatina 1 α (HP1 α)

Se ha comprobado que ADNP interactúa con la cromatina en las células P19 diferenciadas. Además, en la proteína ADNP se ha identificado una región de unión a la proteína heterocromatina 1 α (HP1 α). La interacción se produce mediante la región de unión denominada PxVxL (Thiru et al., 2004). Esta región de unión está conservada en humanos, ratas y ratones. HP1 α se asocia a la regulación epigenética de la expresión de genes a través de este dominio conservado en la proteína ADNP. HP1 α también se asocia con la regulación de la transcripción mediante la interacción con la cromatina y una serie de proteínas nucleares (Lechner, Schultz, Negorev, Maul, & Rauscher, 2005). HP1 α participa en la condensación de la cromatina y tiene una función bien establecida en la heterocromatina, mediando el silenciamiento de genes (Eissenberg & Elgin, 2000), conduciendo hacia la diferenciación celular (Cammis et al., 2002) y cambiando el grado de asociación de la cromatina (Meshorer et al., 2006).

ADNP y HP1 α se unen e interactúan juntos en las células diferenciadas y no diferenciadas.

1.2.7.- ADNP y el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF

El complejo SWI/SNF de mamíferos es un complejo remodelador de cromatina multiprotéico que está formado por al menos diez elementos. Existen dos complejos SWI/SNF diferentes, caracterizados por la presencia de una única subunidad: BAF250 o BAF180, que se definen como BAF o PBAF respectivamente. BAF puede contener BRG1 o BRM como subunidad motora central, mientras que PBAF solo contiene BRG1 (CRISTIANO SIMONE, 2006).

En vertebrados, la remodelación de la cromatina dependiente de ATP está mediada por el complejo BAF (del inglés *BRG1-associated factors*). El complejo BAF en humanos está formado por 15 subunidades, donde una de las dos subunidades del núcleo es homóloga a la ATPasa y siempre está presente: SMARCA4 o SMARCA2 (Ronan, Wu, & Crabtree, 2013). La composición exacta de las subunidades del complejo remodelador de la cromatina determina las características funcionales y la especificidad del tejido. Respecto al desarrollo neuronal, un cambio de tres subunidades en la composición del complejo predispone a las células progenitoras neuronales hacia un estado post-mitótico e inicia de forma dependiente el crecimiento de dendritas y el

desarrollo axonal. Esta transición ocurre en todas las neuronas e ilustra el papel del complejo BAF en el desarrollo (Lessard et al., 2007). Los defectos que se produzcan en el funcionamiento global del complejo pueden resultar en múltiples defectos en el organismo (Ho & Crabtree, 2010).

ADNP es clave para el correcto funcionamiento del complejo BAF (Figura I.4). La relación funcional entre ADNP y el complejo BAF se produce mediante interacciones proteína-proteína de ADNP con varias de las subunidades de BAF (Mandel & Gozes, 2007). ADNP se une directamente a BRG1 a través de su extremo carboxilo terminal. Además, se ha demostrado la existencia de interacciones recíprocas entre ADNP, la proteína HP1 α y el complejo BAF. ADNP es reclutado hacia la heterocromatina pericentromérica mediante la unión del motivo PxVxL y el motivo ARK a la proteína HP1 α . ADNP, mediante los dedos de cinc y el dominio homeobox, funciona como una proteína de anclaje que se une a posiciones específicas en el ADN para guiar a las proteínas del complejo remodelador de la cromatina hacia las regiones diana. Por este motivo, una disfunción de ADNP resulta en una desregulación de la remodelación de la cromatina mediada por BAF.

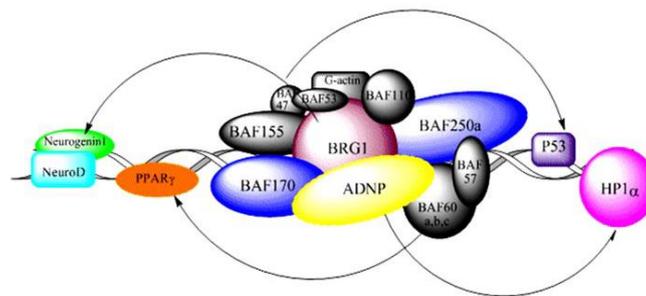


Figura I.4.- Esquema de la interacción entre ADNP y el complejo remodelador de la cromatina. Este esquema ilustra las interacciones explicadas en el texto entre ADNP, las proteínas del complejo remodelador de la cromatina y con la proteína HP1 α . Esquema tomado de Mandel & Gozes, 2007.

1.3.-Péptido NAP

El péptido NAP es un potente neuropéptido derivado de la proteína ADNP que posee una función neuroprotectora. Mediante el escaneo de la proteína ADNP con el objetivo de encontrar fragmentos activos, se encontró este péptido, cuya secuencia de aminoácidos es Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln o NAPVSIPQ según el código de aminoácidos basado en una única letra. Como se ha mencionado previamente, la proteína ADNP proporciona neuroprotección a concentraciones muy bajas. En los cultivos celulares, se ha demostrado que NAP proporciona protección frente a toxicidad asociada con el péptido beta-amiloide, bloqueo eléctrico, frente a estrés oxidativo, privación de nutrientes e intoxicación con cinc.

NAP se ha identificado como un potente neuroprotector en un modelo animal de deficiencia en apolipoproteína (ratón knockout para ApoE) (Bassan et al., 1999).

Debido a que el transportador de lípidos, ApoE, se considera un factor de riesgo en la enfermedad del Alzheimer (Bassan et al., 1999; Gozes et al., 1997), y a que los ratones heterocigotos para ADNP exhiben déficits en la memoria a corto plazo que mejora con el tratamiento crónico con NAP, se considera a este péptido como un tratamiento prometedor contra los déficits de memoria a corto plazo asociados con el Alzheimer. Mediante el empleo de un modelo animal en el cual se induce un deterioro del sistema cognitivo mediante el bloqueo de la absorción de colina, se ha visto que NAP es capaz de mejorar este deterioro. Tras la administración intranasal del péptido NAP a estos animales, se observa una mejora del rendimiento en el test de Morris (Gozes, Giladi, et al., 2000). Otros experimentos han identificado a NAP como un factor neurotrófico, de forma que estimula la elongación de las neuritas (Lagrèze et al., 2005; Smith-Swintosky, Gozes, Brenneman, D'Andrea, & Plata-Salaman, 2005; Visocek, 2005). De forma colectiva, estos resultados proporcionan las bases para el desarrollo de dos formulaciones de NAP: AL-108 para la administración intranasal, y AL-208 para la administración intravenosa.

1.3.1.- Desarrollo del péptido NAP como agente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (ejemplo de la enfermedad de Alzheimer)

Vamos a partir de la enfermedad de Alzheimer para poder entender los antecedentes por los que se llega al posible uso de NAP como terapia. Las deficiencias del aprendizaje, la memoria y otros aspectos de la cognición que son característicos de la enfermedad del Alzheimer, pueden ser el resultado de déficits en la neurotransmisión colinérgica. Se sabe desde hace varios años que las neuronas requieren factores neurotróficos para su desarrollo y supervivencia. En ausencia de estos factores se produce la muerte celular programada (apoptosis). Las neuronas colinérgicas de la parte basal del cerebro anterior expresan receptores del factor de crecimiento nervioso (NGF). Se ha visto que el tratamiento con NGF promueve la supervivencia de estas neuronas en los modelos animales. Por lo tanto, es razonable considerar que una insuficiencia en los factores neurotróficos puede contribuir a la degeneración neuronal prematura de las neuronas colinérgicas en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Sin embargo, existen una serie de obstáculos para el uso terapéutico de las proteínas neurotróficas. Estos problemas serían la llegada de estos factores a las regiones cerebrales apropiadas y los efectos adversos que se puedan producir, tales como toxicidad sistémica o proliferación deletérea de las células de la glía. Si se administra de forma sistémica el factor de crecimiento nervioso (NGF), este no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Se puede realizar una administración intraventricular, pero para ello se requiere la implantación quirúrgica de un sistema de bombeo, que conlleva el riesgo de una infección grave junto con otros efectos adversos significativos. La terapia génica también es posible, pero requiere manipulaciones genéticas además de invasivas (Tuszynski et al., 2005).

Una aproximación alternativa para el desarrollo de terapias neurotróficas para el Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas, es el uso de pequeños péptidos con actividad neurotrófica/neuroprotectora que puedan llegar al tejido cerebral. En este momento es cuando entran en juego ADNP, y NAP, como péptido con función neurotrófica y neuroprotectora.

Como se ha mencionado previamente en esta Tesis Doctoral, ADNP es un gen altamente conservado (Bassan et al., 1999; Zamostiano et al., 2001) que es crucial para la formación del cerebro (Pinhasov et al., 2003) y su mantenimiento (Furman et al., 2004; Gozes, Zaltzman, et al., 2005; Zaltzman et al., 2004). ADNP es secretado desde las células de la glía para proporcionar neuroprotección (Furman et al., 2005). Como se ha indicado al inicio de este apartado, mediante el escaneo de la proteína ADNP para detectar fragmentos con actividad, se localizó un péptido formado por ocho aminoácidos: Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln o NAPVSIPQ según el código de aminoácidos basado en una única letra. De forma abreviada se conoce a este péptido como NAP. Esta secuencia posee actividad neuroprotectora, lo que atribuye a ADNP una función muy importante. Como posible uso terapéutico, NAP puede administrarse de forma intranasal (Gozes, Giladi, et al., 2000) o por vía intravenosa (Leker et al., 2002). NAP proporciona protección a las células nerviosas a concentraciones muy bajas. Estos datos hicieron posible que se realizara una formulación de fármacos neuroprotectores para el tratamiento del Alzheimer (Bassan et al., 1999; Gozes, Giladi, et al., 2000). El interés por NAP creció debido a su eficacia en cultivos de células neuronales (Tabla I.1) y en modelos animales, protegiendo a estos frente a la toxicidad asociada a los beta-amiloides, la excitotoxicidad producida por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bassan et al., 1999), frente al bloqueo eléctrico producido por la tetrodotoxina (Bassan et al., 1999), frente a GP-120 (la proteína de la envoltura del virus del SIDA) (Bassan et al., 1999), frente al estrés oxidativo (Bassan et al., 1999; Offen et al., 2000; Steingart, Solomon, Brenneman, Fridkin, & Gozes, 2000; Wilkemeyer, Menkari, Spong, & Charness, 2002; Zemlyak, Furman, Brenneman, & Gozes, 2000), la deprivación de glutatión (Offen et al., 2000), el daño producido por alcohol (Wilkemeyer et al., 2003), la dopamina (Offen et al., 2000), la toxicidad del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Beni-Adani et al., 2001), frente a la deprivación de nutrientes (Lagrèze et al., 2005; Zemlyak et al., 2000), y frente a la toxicidad producida por el cinc (Divinski, Mittelman, & Gozes, 2004). En los modelos animales (Tabla I.2), se ha observado que NAP es capaz de ejercer neuroprotección *in vivo* frente a la deficiencia en ApoE (Bassan et al., 1999), lesiones cerebrales traumáticas (Beni-Adani et al., 2001; Zaltzman, Alexandrovich, Trembovler, Shohami, & Gozes, 2005), accidente cerebrovascular (Leker et al., 2002), síndrome de alcoholismo fetal, estrés oxidativo severo (Spong, Abebe, Gozes, Brenneman, & Hill, 2001; Wilkemeyer et al., 2003) y frente a la toxicidad colinérgica (Gozes, Giladi, et al., 2000).

Tabla I.1.- Resumen de los efectos de NAP sobre diferentes modelos *in vitro*. Modificado de Gozes, Morimoto, et al., 2005

Modelo	Agente causante de daño celular	Concentración a la que se ejerce protección
Líneas celulares		
Células de feocromocitoma de rata (PC12)	Estrés oxidativo (H ₂ O ₂)	10 ⁻¹⁷ – 10 ⁻¹⁴ M
	Toxicidad por dopamina	10 ⁻¹⁸ – 10 ⁻¹⁰ M
	Toxicidad producida por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α)	10 ⁻¹⁴ M
Neuroblastoma humano	Reducción del glutatión (GSH)	10 ⁻¹⁴ – 10 ⁻⁷ M
Sensibilidad a alcohol	Toxicidad producida por el alcohol	>10 ⁻¹⁶ M
Cultivos primarios (células de rata)		
Neuronas corticales en cultivos mixtos de neuronas y células de glía	Toxicidad relacionada con la enfermedad del Alzheimer (péptido β -amiloide)	10 ⁻¹⁶ – 10 ⁻¹⁵ M
	Toxicidad relacionada con SIDA (gp120)	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻²⁰ M
	Excitotoxicidad (NMDA)	10 ⁻¹⁶ – 10 ⁻⁸ M
	Bloqueo eléctrico (tetrodoxina)	10 ⁻¹⁸ – 10 ⁻¹⁴ M 10 ⁻¹¹ – 10 ⁻⁹ M
Cultivos enriquecidos en neuronas corticales	Deprivación de glucosa	10 ⁻¹² M
Astrocitos corticales	Toxicidad producida por cinc	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻¹⁰ M
Células ganglionares de la retina	Medio libre de suero	10 ⁻¹⁴ – 10 ⁻¹⁰ M
Cultivos de neuronas del hipocampo de rata	Crecimiento de neuritas ralentizado	10 ⁻¹⁶ – 10 ⁻¹² M
Cultivos primarios (células humanas)		
Neuronas corticales embrionarias humanas	Síndrome de Down	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻¹³ M
	Estrés oxidativo (H ₂ O ₂)	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻¹³ M

Tabla I.2.- Resumen de los efectos de NAP sobre diferentes modelos *in vivo*. Modificado de Gozes, Morimoto, et al., 2005.

Modelo	Especie	Administración de NAP	Dosis Protectoras	Efectos que produce el tratamiento
Deterioro del Sistema Cognitivo	Rata	Administración crónica por vía intranasal	2 μ g/kg	Mejora la capacidad cognitiva
Deficiencia en apolipoproteína E	Ratón	Administración crónica por vía subcutánea	0,25 – 0 5 μ g/g	Mejora la capacidad cognitiva
Trauma cerebral	Ratón	Administración por vía subcutánea	0,25 – 0,3 μ g/g	Reduce la mortalidad y mejora la recuperación
	Ratón	Administración crónica por vía subcutánea	0,25 – 0,5 μ g/g	Mejora la recuperación y mejora la capacidad cognitiva
Oclusión de la arteria cerebral	Ratas con hipertensión	Administración por vía intravenosa	3.30 μ g/kg	Protege frente a la apoptosis y mejora la recuperación
Mediana edad	Rata	Administración crónica por vía intranasal	2 μ g/kg	Mejora la capacidad cognitiva
	Ratón	Administración crónica por vía intranasal	12,5 μ g/kg	Ansiolítico
Esclerosis múltiple (encefalomielitis autoinmune)	Ratón	Administración crónica por vía intranasal	20 μ g/kg	Protege frente a la parálisis
	Ratón	Administración por vía intravenosa	0,3 μ g	Protege frente a la parálisis y el daño axonal
Síndrome alcohólico fetal	Ratón	Administración intraperitoneal	1 – 2 μ g/g	Protege frente al daño fetal

1.3.2.- Mecanismo de acción del péptido NAP

Como hemos visto, la administración de NAP produce un amplio espectro de efectos neuroprotectores tanto *in vitro* como *in vivo*. La pregunta que surge es cómo un simple compuesto puede proporcionar neuroprotección con un espectro de acción tan amplio.

Hay que recordar que NAP deriva de la proteína neuroprotectora dependiente de actividad ADNP, la cual es una proteína altamente conservada en humanos y roedores y que es esencial para la formación y función del cerebro (Bassan et al., 1999; Pinhasov et al., 2003; Zamostiano et al., 2001). Mediante el uso de anticuerpos que reconocen el motivo de la secuencia NAP, se demostró que ANDP interactúa con la red de microtúbulos (Furman et al., 2004). Concretamente, se identificó la unión de NAP a la tubulina, la cual es la subunidad principal de los microtúbulos. Mediante cromatografía de afinidad se detectó que la unión de NAP a la tubulina se encuentra favorecida en astrocitos (Divinski et al., 2004). NAP es capaz de penetrar en las células e interactuar directamente con la red de microtúbulos. Diversos estudios han demostrado que NAP promueve el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos (Gozes, 2004).

Los microtúbulos son elementos clave del citoesqueleto que se encuentran en todas las células eucariotas. Proporcionan soporte estructural, participan en la segregación de los cromosomas y en el tráfico intracelular. Además, los microtúbulos neuronales son esenciales para el transporte axonal y la transmisión de sinapsis (Baas & Ahmad, 2013; Verhey & Gaertig, 2007). Por ello, los microtúbulos son las mayores dianas reguladoras para la regeneración axonal. De esta forma, su estabilidad y organización determinan el destino de los axones (Erturk, Hellal, Enes, & Bradke, 2007). El principal componente del tubo que forma los microtúbulos es el heterodímero formado por la α y la β tubulina. El isotipo β -III-tubulina es un marcador neuronal durante el desarrollo embrionario y en la maduración del sistema nervioso humano (Katsetos, Herman, & Mörk, 2003; Ludueña, 1998). La β -III-tubulina juega un papel fundamental en la neurogénesis temprana, de forma simultánea o coordinada con otras proteínas asociadas a microtúbulos (proteínas MAPs) (Ferreira & Caceres, 1992), de forma que promueve la extensión de las neuritas potenciando la polimerización de los microtúbulos durante la neuritogénesis temprana (Gard & Kirschner, 1985).

Mediante la incubación del péptido NAP con cultivos de células de la neuroglia, se ha observado una unión preferente de NAP por la tubulina neuronal (Gozes & Barnstable, 1982). Esto indica que la exposición de las células con NAP conduce a la polimerización de los microtúbulos, produciendo estructuras similares a mallas en los cuerpos neuronales. También se ha observado un crecimiento de las neuritas cuando estas son tratadas con el péptido, de forma que puede encontrarse el doble de neuritas en los cultivos tratados con NAP con respecto a los no tratados. Cabe destacar que los cambios en la organización de los microtúbulos y en la morfología celular también se detectan a nivel celular (Divinski, Holtser-Cochav, Vulih-Schultzman, Steingart, & Gozes, 2006).

Por tanto, el péptido NAP protege a las neuronas a través de la reorganización de los microtúbulos (Divinski et al., 2006, 2004), promoviendo el crecimiento de las neuritas (Gozes & Spivak-Pohis, 2006) y proporcionando neuroprotección. El mecanismo de acción de NAP involucra (Oz, Ivashko-Pachima, & Gozes, 2012):

- 1.- Cambios rápidos en la estabilidad de los microtúbulos mediante cambios en el ciclo de tirosinación de la α -tubulina.
- 2.- Incremento del contenido de microtúbulos y protección frente a la disrupción de microtúbulos.
- 3.- Incremento de la dinámica de microtúbulos en el crecimiento del cono axonal.
- 4.- Incremento del área de trabajo de los microtúbulos en la célula.
- 5.- Inducción de la diferenciación neuronal a nivel de la expresión de β -III-tubulina.

El péptido NAP afecta a la invasión de los microtúbulos en los conos de crecimiento en las células neuronales primarias. Las neuronas primarias poseen, dependiendo de la localización celular, una gran cantidad de modificaciones postranscripcionales (PTMs) de los microtúbulos (Arregui, Busciglio, Caceres, & Barra, 1991; Jennetta W. Hammond,*† Chun-Fang Huang & Catherine Jacobson,‡§ Gary Banker, 2010). En las neuronas primarias, los mayores cambios que acompañan a la transformación de las neuritas hasta el futuro axón se producen en el cono de crecimiento. Esto involucra un incremento en el crecimiento del tamaño del cono axonal, la expansión de los lamelipodios, un acortamiento de los filamentos de actina, un incremento en la dinámica de la actina, un incremento en el número y longitud de los microtúbulos recién ensamblados y la penetración de los microtúbulos hasta los dominios central y periférico del cono de crecimiento (Bradke & Dotti, 1997; Bradke, Dotti, Bradke, & Dotti, 2016; Kunda, Paglini, Quiroga, Kosik, & Cá Ceres, 2001).

El tratamiento con NAP también incrementa la expresión de la β -III-tubulina en las células PC12 (Oz et al., 2012). Se sabe que el tratamiento con NAP:

- 1.- Incrementa la red de microtúbulos en las células PC12, lo cual precede al “brote” de nuevas neuritas.
- 2.- Afecta a la dinámica de microtúbulos en la invasión hasta el cono de crecimiento en neuronas primarias.

Tras la realización de diferentes estudios, se ha visto que NAP ejerce su función sobre los microtúbulos mediante su interacción con las proteínas de unión a microtúbulos (EBs). La familia de proteínas de unión a los microtúbulos está formada por tres miembros: EB1, EB2 y EB3. Para entender la dependencia de estas proteínas respecto a la actividad de NAP, se han realizado diferentes experimentos consistentes en el silenciamiento de las diferentes proteínas de unión a microtúbulos y se evaluó también la actividad de NAP mediante el estudio de los microtúbulos. Para analizar la

protección que ejerce NAP frente al silenciamiento de estas proteínas, se usó la toxicidad producida por el zinc, ya que se conoce que:

1.- Altas concentraciones de zinc conducen hacia la despolimerización de los microtúbulos, lo cual es revertido por NAP en las neuronas (Divinski et al., 2006), en células de la glía (Divinski et al., 2004) y en las células PC12 (Oz et al., 2012).

2.- La toxicidad del zinc induce la neurodegeneración (Oz et al., 2012).

Cuando las proteínas EBs están silenciadas (no se expresan), aunque se añada el péptido NAP al cultivo celular, no se produce la neuroprotección. Por tanto, NAP requiere que la expresión de EB1 y EB3 esté intacta para llevar a cabo su función protectora (Oz et al., 2014).

Por tanto, el mecanismo mediante el que NAP ejerce sus funciones neuroprotectoras involucra el mantenimiento de la dinámica de la red de microtúbulos, mediante la interacción directa con los elementos que les forman.

1.3.3.- Características moleculares del péptido NAP

NAP posee un peso molecular de 824,9 g/mol. La estructura secundaria de NAP se ha determinado tanto en soluciones acuosas como orgánicas mediante una serie de estudios de dicroísmo circular. De esta forma se vio que NAP es soluble tanto en soluciones acuosas como en soluciones orgánicas.

NAP es estable durante al menos 24 meses cuando se almacena a una temperatura de -20°C y durante 3 meses cuando se almacena a 25°C con una humedad relativa del 60 % ó a 40°C con una humedad relativa del 75 %. Durante estos periodos de tiempo y bajo estas condiciones, no se han observado cambios en la apariencia y pureza de NAP.

La secuencia primaria de NAP presenta las siguientes características estructurales y funcionales:

- Permite la penetración a través de las membranas lipídicas, como es el caso de la membrana celular y de la barrera hemato-encefálica.
- Se une a la tubulina y promueve el ensamblaje de los microtúbulos.
- Posee características intrínsecas que le permiten desplegar la estructura de lámina β de otras proteínas, actuando por tanto como un péptido chaperona que protege frente a la toxicidad de las placas β -amiloides asociadas con el Alzheimer.

1.4.- Síndrome ADNP

El autismo es un trastorno del desarrollo neuronal caracterizado por limitaciones en la interacción social y la comunicación en combinación con estereotipias, comportamiento repetitivo y una falta de interés (American Psychiatric Association, 2013). Los síntomas normalmente aparecen antes de los 3 años de edad. La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado en las últimas décadas, afectando a 1 de cada 68 individuos (U.S. Department of Health and Human Services, 2014). En toda la población estudiada se ha observado algún componente genético subyacente. La probabilidad de heredabilidad es de un 50 %, con un incremento del riesgo de 10 veces en familiares de primer grado y de 2 veces en familiares de segundo grado (Sandin et al., 2014).

El síndrome del espectro autista se define como autismo en combinación con otros síntomas clínicos. A menudo se observa comorbilidad que incluye discapacidad intelectual, epilepsia y desordenes psiquiátricos.

Las causas monogénicas más frecuentes del síndrome del espectro autista incluyen el Síndrome del X Frágil y el Síndrome de Rett (Amir et al., 1999; Rooms & Kooy, 2011). Los síndromes genéticos específicos que causan el autismo (deleciones cromosomales submicroscópicas o duplicaciones en posiciones fijas del genoma) incluyen la duplicación 15q11-13 del Síndrome de Prader-Willi/Angelman y las variantes de copia numérica recurrentes (CNV) en la región 16p11.2 (Sanders et al., 2011). También existen anormalidades cromosómicas visibles microscópicamente asociadas con el autismo como son el Síndrome del cromosoma 15 isodicéntrico (Mendelsohn & Schaefer, 2008). Al comparar pacientes sanos y controles junto con pacientes con trastornos del espectro autista (ASD), también se ha observado un exceso de CNVs *de novo* no recurrentes (Pinto et al., 2010).

En la actualidad también se utilizan la secuenciación del genoma y del exoma para la identificación de genes relacionados con el autismo. Esta aproximación se basa en que anteriormente ya se ha utilizado la secuenciación del genoma para la identificación de las causas genéticas de trastornos del desarrollo neurológico (Veltman & Brunner, 2012). En el estudio de Veltman y Brunner comenzó a emplearse el denominado “estudio trío”, el cual consiste en realizar la secuenciación del exoma del paciente y del exoma de los padres del paciente. En el autismo, mediante la secuenciación del exoma, se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) deletéreos que son más prevalentes en pacientes con familiares que no están afectados o en controles. Los genes que frecuentemente presentan mayor tasa de mutación en pacientes con autismo son *CDH8*, *SCN2A*, *DYRK1A* y *CTNNB1* (Krumm, O’Roak, Shendure, & Eichler, 2014; Roak et al., 2012). Muchos genes implicados en el Síndrome de Espectro Autista han sido previamente identificados por ser la causa de otras enfermedades: enfermedades infecciosas, epilepsia, esquizofrenia o trastornos bipolares. Esto sugiere una superposición en la etiología subyacente de los trastornos del desarrollo neurológico.

Actualmente, las anomalías genéticas identificadas para el autismo explican el 15 % de los casos (Carter & Scherer, 2013; Mendelsohn & Schaefer, 2008). En el 1 % de los casos no hay un único gen mutado, los genes que producen el autismo convergen funcionalmente afectando a rutas celulares y a las redes de interacción proteína-proteína (Krumm et al., 2014; O’Roak et al., 2012; Pinto et al., 2014). Las rutas más afectadas son la vía de señalización Wnt, la vía que implica la función sináptica y la ruta de remodelación de la cromatina.

1.4.1.- Identificación de mutaciones en ADNP en pacientes con autismo

Con la intención de identificar nuevos genes causantes del autismo, en diferentes trabajos se ha analizado una gran cohorte de pacientes con autismo. En uno de estos estudios se identificó la primera mutación *de novo* en la proteína neuroprotectora dependiente de actividad (*ADNP*): p.Lys408Valfs*31 (O’Roak et al., 2012). En total, se secuenció el genoma de 209 familias en busca de alguna mutación más, pero no se encontraron nuevas mutaciones, ni en el gen *ADNP* ni en ningún otro gen. Por este motivo se re-secuenciaron los genes candidatos con mayor probabilidad de presentar alguna mutación, incluyendo al gen *ADNP*. Para ello se utilizó la tecnología de secuenciación MIP (del inglés *Molecular Inversion Probe*) (Roak et al., 2012). En este estudio se incluyeron 2.446 probandos, y se encontró la mutación *de novo* adicional p.Tyr719*, al igual que la anterior mutación citada, también en el gen *ADNP*.

También se han buscado posibles mutaciones en la cohorte que compone el NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), encontrándose la mutación p.Gly1094Profs*5, heredada de un progenitor no afectado. Esta mutación está localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína *ADNP*, tras el último dominio funcional conocido.

En el proceso de optimización del diagnóstico para la introducción de la secuenciación del exoma como herramienta de diagnóstico, se descubrió otra mutación en *ADNP*. Esta vez en una cohorte de pacientes pequeña. Estos pacientes sufrían autismo y/o discapacidad intelectual (Helsmoortel et al., 2015). Tras estudiar una cohorte de 148 pacientes con autismo, no se encontró ninguna otra mutación. Combinando los datos de la secuenciación del exoma y mediante la re-secuenciación realizada en múltiples centros, se identificaron 10 pacientes con mutaciones en *ADNP* (Helsmoortel et al., 2014). Con estos datos, se puede decir que la frecuencia de mutaciones *de novo* en *ADNP* es significativamente alta ($p = 0,001852$) en pacientes comparando la cohorte procedente de ESP y de controles adicionales obtenidos desde la base de datos Simons Siblings. En la tabla 1.3 se puede encontrar un resumen con las mutaciones encontradas hasta el momento en *ADNP* relacionadas con el Síndrome de Espectro Autista.

Tabla I.3.- Mutaciones encontradas hasta el momento en el gen *ADNP* relacionadas con el Síndrome *ADNP*. Las coordenadas hacen referencia al genoma GRC37. Modificado de Helsmoortel et al., 2014.

Mutación en el ADN genómico (chr20)	Mutación en el ADNc complementario (NM_015339.2)	Proteína	Tipo de mutación	Heredabilidad
g.49508752_49508755delTTTA	c.2496_2499delTAAA	p.Asp832Lys*80	Cambio del marco de lectura	de novo
g.49510040G>T	c.1211C>A	p.Ser404*	Sin sentido	de novo
g.49510028_49510029delTT	c.1222_1223delIAA	p.Lys408Valfs*31	Cambio del marco de lectura	de novo
g.49509086_49509098delATTGCTCGTAAG	c.2153_2165delCTTACGAGCAAAT	p.Thr718Glyfs*12	Cambio del marco de lectura	de novo
g.49509094G>C	c.2157C>G	p.Tyr719*	Sin sentido	de novo
g.49508757_49508760delTTAA	c.2491_2494delTTAA	p.Lys831Ilefs*81	Cambio del marco de lectura	de novo
g.49508443delG	c.2808delC	p.Tyr936*	Cambio del marco de lectura	de novo
g.49509321G>A	c.1930C>T	p.644Arg*	Sin sentido	Padres no secuenciados
g.49509094_49509095insT	c.2156_2157insA	p.Tyr719*	Cambio del marco de lectura	de novo

1.4.2.- Mecanismo mutacional del gen *ADNP*

Todas las mutaciones encontradas hasta el momento en el gen *ADNP* se producen en heterocigosis (en homocigosis, como ya se ha mencionado con anterioridad, la mutación es letal en ratón). Además, van acompañadas de un desplazamiento en el marco de lectura, o son variantes sin sentido. Todas las mutaciones se localizan en el extremo 3' del último exón de *ADNP* (en el exón 5, donde, hay que recordar, se localizan codificados los dominios funcionales de la proteína) (Helsmoortel et al., 2014).

Las mutaciones conocidas hasta la fecha en *ADNP* conllevan una pérdida de al menos 116 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína. Dado que todas las mutaciones se localizan en la misma región, es lógico pensar que las mutaciones se deben a un mecanismo mutacional como resultado de la arquitectura local del genoma. Sin embargo, en la región donde se codifica el gen *ADNP* no existen repeticiones simples o en tándem. Al estudiar los niveles de ARN mensajero de *ADNP* en células procedentes de pacientes que poseen mutaciones con parada de lectura de la proteína, no se ha encontrado que estos niveles de expresión estén desregulados (Helsmoortel et al., 2014; Kervestin & Jacobson, 2012). Sin embargo, sí se ha observado una sobreexpresión de *ADNP* en estos pacientes. Se ha hipotetizado sobre una posible auto-regulación de la expresión del gen *ADNP* mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Oz et al., 2012). Según esta hipótesis, en los pacientes con una mutación en el gen *ADNP*, se produciría una incapacidad de la proteína mutante para unirse a su propia región promotora y llevar a cabo el mecanismo de retroalimentación negativa. De esta forma, se habría un defecto en la regulación de la transcripción de este gen.

Esta hipótesis se corresponde con un mecanismo cuyo resultado es una mutación dominante negativa. La reducción de la expresión de *ADNP* en las muestras haploinsuficientes podría indicar que la proteína mutada desregula la

retroalimentación. Esta desregulación debería ser consecuencia de la incapacidad de los cofactores de la región promotora, mientras que, a la vez, la proteína no mutada se une al sitio de unión del promotor. La proteína ADNP mutada podría ocupar secuencias diana alternativas, aunque no sea capaz de unirse, por ejemplo, a la proteína HP1 α ni a BAF. A pesar de la presencia del complejo BAF funcional, la remodelación de la cromatina se encuentra obstaculizada conduciendo a alteraciones en los patrones de expresión génica de los genes regulados por *ADNP*.

1.4.3.- Características clínicas del Síndrome ADNP

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una enfermedad rara es aquella que tiene una baja frecuencia en la población, afectando a un número limitado de personas. Para considerar a una enfermedad o síndrome como rara, esta debe afectar a menos de 5 de cada 10.000 habitantes. El Síndrome ADNP (también conocido como Síndrome Helsmoortel-VanDerAa, HDVAS) puede englobarse dentro del grupo de enfermedades raras, ya que su prevalencia se estima en 1 de cada 27.000 niños en Estados Unidos y Europa (Fuente: ADNP Kids Research Foundation). Se trata de un desorden genético complejo que afecta principalmente al desarrollo de los pacientes que presentan mutaciones en el gen *ADNP*.

Con el objetivo de poder unificar las características clínicas comunes de este Síndrome, se ha creado el Consorcio ADNP, el cual está integrado por diversos investigadores y personal médico implicados en la investigación de este síndrome. Entre los integrantes de este consorcio, se encuentra la fundación ADNP Kids, la cual está formada por los padres de los pacientes. Hasta la fecha actual, han sido descritos 71 pacientes procedentes de 16 países con mutaciones en el gen *ADNP*. Gracias al estudio y a la información recabada por el Consorcio ADNP, sabemos que la mutación más frecuente a nivel proteico es p.Tyr719*. Además, también se han recopilado las diferentes anomalías y manifestaciones clínicas encontradas en los pacientes con mutaciones en el gen *ADNP*. Estas manifestaciones clínicas afectan a todas las áreas y sistemas del cuerpo. A continuación, se describen brevemente y se encuentran resumidas en la figura I.5.

- Anormalidades congénitas: Problemas renales, anomalías en pies y manos, problemas cardíacos.
- Apariencia facial: Frente prominente con una línea de nacimiento del cabello alta, puente nasal ancho, nariz pequeña, orejas pequeñas con una implantación baja.
- Crecimiento y Sistema Endocrino: Baja estatura, deficiencias hormonales, hipotiroidismo.
- Desarrollo: Retraso en el desarrollo motor, hipotonía, patrón de marcha anormal, retraso en el habla.
- Características autistas: Fuerte interés sensorial, uso repetitivo de objetos, movimientos estereotipados, trastorno del procesamiento

sensorial, problemas de conducta, alto umbral del dolor, hiperactividad, problemas de sueño, ansiedad, comportamiento auto-agresivo.

- Sistema Nervioso: Discapacidad intelectual, diversas anomalías cerebrales.
- Sistema Digestivo: Problemas gastrointestinales, gran apetito, problemas de movimiento oral, problemas con la aspiración.
- Problemas visuales: Hipermetropía, estrabismo, miopía y astigmatismo.
- Otros problemas: Hipermovilidad articular, escoliosis leve, problemas de cadera, infecciones recurrentes.

Características Clínicas del Síndrome ADNP

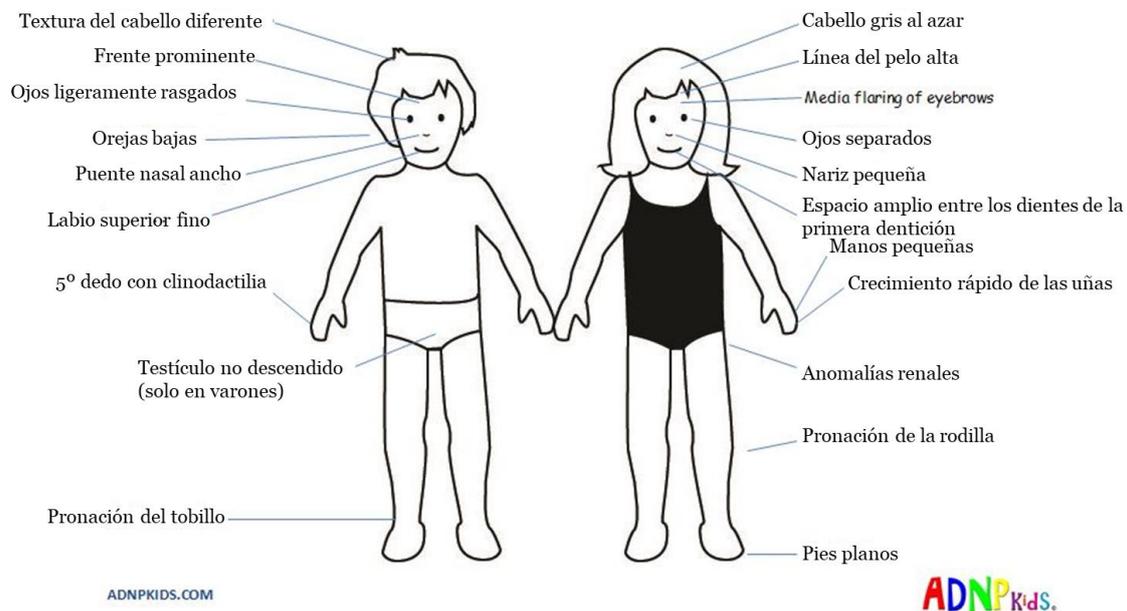


Figura 1.5.- Características del Síndrome ADNP. Este esquema refleja las manifestaciones más comunes en los pacientes que presentan mutaciones en el gen *ADNP*. Las manifestaciones pueden presentarse tanto en varones como en hembras, con independencia de donde se localicen en el esquema. Imagen tomada y modificada de ADNPkids.com.

1.5.- Modelo celular de piel

1.5.1.- Estructura y organización de la piel

La piel es el órgano que cubre toda la superficie corporal, formando una barrera protectora frente a las agresiones externas: radiación ultravioleta, infecciones y pérdida de agua. Además, este órgano se encuentra en continua renovación. También se trata de un órgano sensorial, ya que posee receptores específicos para el calor, el frío, el dolor y los estímulos vibratorios. Este órgano está compuesto por dos capas que interactúan entre sí: la epidermis y la dermis (Figura 1.6) (Watt, 2014).

La epidermis es la capa más externa de la piel. Se trata de un epitelio estratificado escamoso queratinizado que está en continua renovación. Las células que componen esta capa de la piel se denominan queratinocitos. La otra capa que compone la piel, la dermis, se localiza por debajo de la epidermis, en la parte más interna de la piel. La dermis está constituida por tejido conectivo cuyo principal componente celular son los fibroblastos. Los fibroblastos son células mesenquimales cuya función es la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Estas células adquieren un papel principal durante la cicatrización de heridas. La epidermis y la dermis están separadas por la membrana basal, la cual está formada por colágeno y laminina.

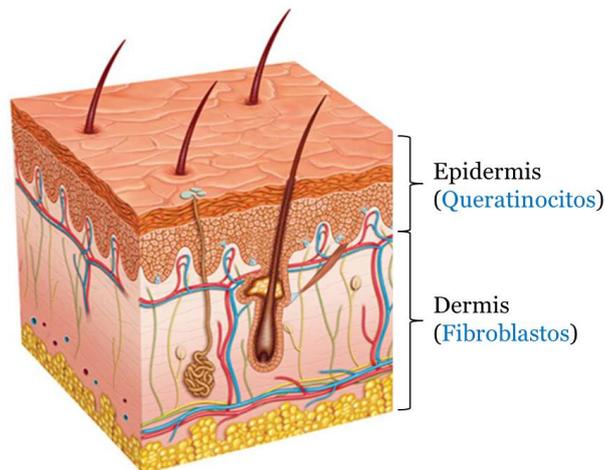


Figura I.6.- Capas que constituyen la piel. La epidermis, la parte más externa, en contacto con el medio exterior, es un epitelio estratificado escamoso. La dermis, la parte más interna, está en constituida por tejido conjuntivo rico en fibras de colágeno.

La epidermis está constituida por cuatro capas a través de las cuales migran los queratinocitos durante el proceso de diferenciación terminal (Figura I.7). Mediante el flujo continuo de células migrando a través de estas cuatro capas, se logra el mantenimiento de la homeostasis del tejido, la cual es necesaria para el correcto funcionamiento de la piel. Estas cuatro capas son:

- Estrato basal: Es la capa germinal de la epidermis, la capa más interna. En esta capa se encuentran las células madre epidérmicas, las cuales poseen una actividad mitótica constante con la función de proporcionar queratinocitos nuevos que reemplacen a los perdidos por descamación.
- Estrato espinoso: Recibe este nombre por el aspecto “espinoso” de las células que lo componen. Estas células se encuentran en proceso de crecimiento y comienzan a sintetizar fibras de queratina.
- Estrato granuloso: Esta capa se caracteriza por los gránulos intracelulares que poseen los queratinocitos y que contribuyen al proceso de queratinización.

- **Estrato córneo:** Corresponde a la capa más externa de la epidermis. En ella los queratinocitos adquieren una forma aplanada y fusiforme. Además, en esta capa las células han perdido el núcleo. El estado de los queratinocitos corresponde al final del proceso de diferenciación terminal, siendo esta la capa en la que se produce la descamación de los queratinocitos.

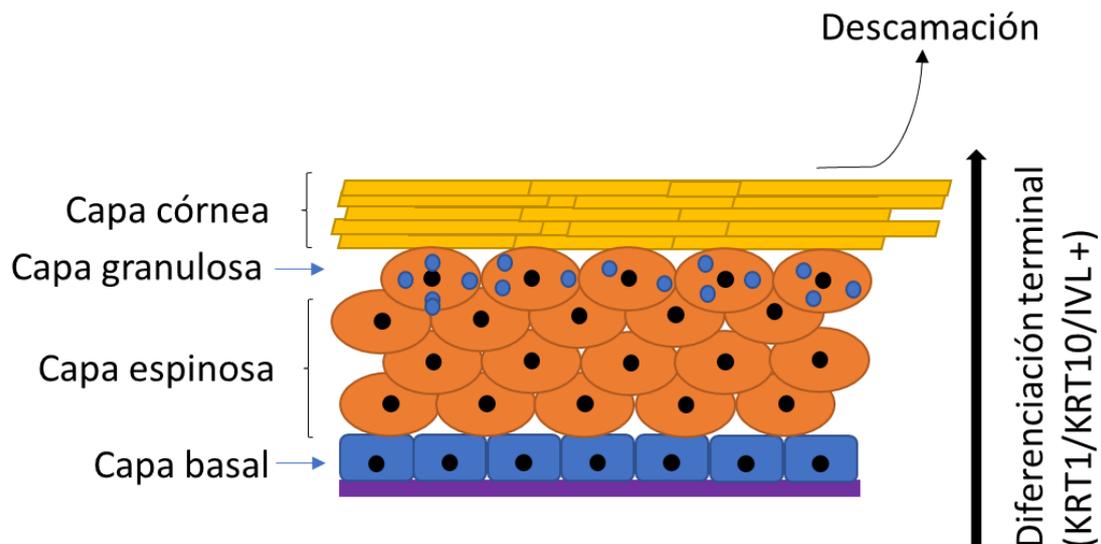


Figura 1.7.- Estratos que constituyen la epidermis. En esta imagen se pueden observar las diferentes capas que forman la epidermis. Se puede observar la dirección en la que se produce la diferenciación terminal de los queratinocitos, desde la capa más interna hacia las capas más externas, produciéndose finalmente la descamación en la capa córnea. También se puede observar como se produce la expresión de los marcadores de diferenciación terminal.

1.5.2.- Proceso de diferenciación terminal de queratinocitos

Cuando los queratinocitos inician el proceso de diferenciación terminal, dan lugar a células diferenciadas, que pierden su capacidad para dividirse y que, como ya se ha comentado, finalmente se desprenden de la epidermis. Este proceso de diferenciación se inicia en la capa basal de la epidermis. Cuando las células madre epidérmicas, que son las que se localizan en la capa basal, comienzan a dividirse, dan lugar a células hijas con un destino celular asimétrico (Watt, Celso, & Silva-Vargas, 2006). Esto significa que las células madre pueden dar lugar a dos células madre, a una célula madre y a una célula comprometida hacia la diferenciación, o pueden dar lugar a dos células hijas comprometidas hacia la diferenciación celular (Fuchs & Chen, 2012). Las células hijas comprometidas hacia la diferenciación, antes de iniciar este proceso, realizan varias rondas de división celular con el objetivo de amplificar el número de células que iniciaran el proceso de diferenciación terminal y que migraran a través de las capas suprabasales de la epidermis. De esta forma se elimina la necesidad de que

sean las células madre epidérmicas las que sufran más divisiones, evitando así posibles errores en la replicación del ADN. Estas células que realizan varias rondas de replicación reciben el nombre de células de amplificación transitoria (TAC, del inglés *Transient Amplified Cells*).

Por tanto, una vez que los queratinocitos inician el proceso de diferenciación terminal, sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. Entre los cambios morfológicos que se producen, el más destacable es el incremento de tamaño celular que sufren los queratinocitos (Sun & Green, 1976). Respecto a los cambios bioquímicos que se producen, cabe destacar el cambio de expresión de los filamentos intermedios de queratina. Los queratinocitos de la capa basal expresan queratinas típicas de esta capa, como son la queratina 5 y la queratina 14. Sin embargo, al iniciar el proceso de diferenciación, comienzan a expresar queratinas típicas de las capas suprabasales. Entre estas queratinas se encuentran la queratina 1 (KRT1) y la queratina 10 (KRT10) (Fuchs & Green, 1980). A estas queratinas se las conoce como queratinas antiproliferativas, ya que la expresión de estos filamentos conlleva una pérdida de la capacidad proliferativa de los queratinocitos. Además de producirse la síntesis de queratinas, durante la diferenciación terminal también se produce la síntesis de involucrina (Watt & Green, 1981). La síntesis de involucrina se relaciona con el incremento del tamaño celular de los queratinocitos (Watt & Green, 1981). De esta forma, se considera a las queratinas 1 y 10 y a la involucrina marcadores del proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos.

1.5.3.- Ciclo celular de los queratinocitos

Al hablar del ciclo celular de los queratinocitos, tenemos que referirnos, por un lado, a los queratinocitos proliferativos de la capa basal de la epidermis, y, por otro lado, a los queratinocitos que están diferenciándose y migrando a través de las capas suprabasales de la epidermis.

1.5.3.1.- Ciclo celular de queratinocitos proliferativos

El ciclo celular de los queratinocitos de la capa basal se corresponde con el modelo clásico del ciclo celular. Por tanto, durante la fase S, la célula replica su genoma completo para dar lugar a una copia idéntica para cada célula hija. Durante la mitosis (fase M), la célula reparte el material genético entre las dos células hijas. La mitosis a su vez se divide en dos fases: división nuclear y división celular. Las fases S y M se separan por dos fases denominadas fases G (del inglés *Gap*). Durante estas fases, la célula se prepara para las siguientes fases del ciclo celular, comprobando que las condiciones para continuar con el proceso son las óptimas y corrigiendo los posibles errores que se hayan producido, a fin de garantizar que la división celular se produzca de manera correcta. Entre la fase M y la fase S se produce la fase G1 y entre la fase S y la fase M se produce la fase G2 (Alberts B, J. A., Lewis J, Raff M, Roberts K, 2007).

Durante las diferentes fases del ciclo celular, se produce la expresión de diferentes ciclinas, según la fase del ciclo. Las ciclinas son proteínas encargadas de regular el ciclo celular mediante su interacción con las quinasas dependientes de ciclinas (cdks, del inglés *Cyclin Dependent Kinases*). Las ciclinas que participan en la regulación del ciclo celular son las ciclinas A, las ciclinas B, las ciclinas D y las ciclinas E (Malumbres & Barbacid, 2009). Durante la fase G1, se induce la expresión de las ciclinas D (Sherr & Roberts, 2004). La ciclina D conduce a la fosforilación de las proteínas de la familia del retinoblastoma (Sherr et al., 2004), lo cual conduce a la liberación de los factores de transcripción de la familia E2F (Weinberg, 1995). De esta forma se inicia la expresión de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Entre estos genes se encuentran la ciclina E y la ciclina A (Lundberg & Weinberg, 1999). Una vez que se expresa la ciclina E, se completa la fosforilación del retinoblastoma y comienza la fase S del ciclo celular. La expresión de la ciclina E es máxima en este punto del ciclo celular. Al inicio de la fase S, comienza la síntesis de las ciclinas A1 y A2. Estas ciclinas están implicadas en el control de la replicación del ADN (Coverley, Pelizon, Trewick, & Laskey, 2000). Una vez finalizada la fase S, la ciclina A se une a su cdk correspondiente (cdk1) y favorece la transición entre las fases G2 y M (fase G2/M). Finalmente, al inicio de la fase M, comienza la síntesis de la ciclina B, la cual es la encargada de completar la mitosis. Tras terminar la mitosis, esta ciclina se degrada mediante el complejo promotor de la anafase, lo cual es necesario para que la célula salga de mitosis (Harper, Burton, & Solomon, 2002).

1.5.3.2.- Ciclo celular de queratinocitos en proceso de diferenciación

En el caso de los queratinocitos que se encuentran inmersos en el proceso de diferenciación terminal, su ciclo celular difiere respecto al ciclo celular clásico. En este caso, los queratinocitos adquieren un ciclo celular característico de la endorreplicación. Tras varias rondas de división celular, su ciclo se desregula, produciéndose una situación de estrés celular que conlleva a errores en la replicación del ADN. La acumulación de errores en el ADN produce un bloqueo mitótico del ciclo celular (Gandarillas & Freije, 2014; Gandarillas, Davies, & Blanchard, 2000; Zanet et al., 2010). Se ha propuesto que este bloqueo mitótico conlleva a una pérdida de adhesión de los queratinocitos a la membrana basal, lo que produce que estas células comiencen a estratificar y a migrar hacia las capas suprabasales de la epidermis (Gandarillas, 2012). A partir de este momento comenzaría el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos. Sin embargo, durante este proceso, siguiendo el modelo de endorreplicación, su ciclo celular continuaría activo. Por tanto, el ADN de estas células seguiría replicándose, originándose células poliploides que también incrementarían su tamaño.

Al existir estas diferencias en el ciclo celular de los queratinocitos que se están diferenciando, cabe esperar que la expresión de las ciclinas también presente diferencias. De esta forma, el patrón de expresión de estas proteínas aporta información que evidencia que los queratinocitos sufren un ciclo endorreplicativo. Por tanto, la expresión de la ciclina E es menor en los queratinocitos de la capa basal, sin embargo, su expresión aumenta en las capas suprabasales más diferenciadas. Es decir, los queratinocitos de las capas suprabasales se encuentran en fase S, produciéndose la replicación de su ADN, lo cual es típico de la endorreplicación. Respecto a la expresión de ciclina A, esta se produce en las células que se localizan en la capa peribasal. La expresión de ciclina E en las capas suprabasales junto con la expresión de ciclina A en la capa peribasal, es un patrón característico de la fase G2 del ciclo celular endorreplicativo. Pero cuando los queratinocitos comienzan a migrar hacia las capas suprabasales, la expresión de ciclina A desaparece. La expresión de la ciclina B es muy corta en el tiempo, detectándose desde el inicio de la mitosis hasta la metafase (Murray, 2004). La expresión de esta ciclina suele ser típica de células que se encuentran aún en la capa basal de la epidermis, aunque también es posible detectarlas en la capa peribasal. En las capas suprabasales, la expresión de la ciclina B es nula, ya que en estas células se está produciendo la replicación del material genético sin producirse la división celular (Zanet et al., 2010). Por tanto, de la falta de expresión de las ciclinas A y B en las capas suprabasales, se deduce la ausencia de división celular, por lo que estas células están sufriendo divisiones nucleares y endomitosis (Zanet et al., 2010).

1.6.-Modelo celular basado en células madre pluripotentes inducidas

1.6.1- Definición y propiedades

Las células madre pluripotentes son células que poseen dos propiedades fundamentales que las definen. La primera de estas características es que poseen capacidad de auto-renovación y supresión de la diferenciación mediante el mantenimiento de la expresión de genes clave que se encuentran implicados en diferenciación. El estado pluripotente está controlado por tres factores de transcripción: *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (Boyer et al., 2005). *OCT4* y *NANOG* son los genes pluripotentes por excelencia, ya que la expresión de ambos es específica en las células madre pluripotentes. *SOX2* adquiere importancia en el establecimiento de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), ya que forma un heterodímero con *OCT4* y ambos son necesarios para la formación de las iPSCs (Avilion et al., 2003). Estos tres factores actúan de forma cooperativa, uniéndose a sus propios promotores y formando un circuito de auto-regulación (Boyer et al., 2005).

La segunda característica es que son capaces de originar tejidos representativos de las tres capas germinales de un embrión en desarrollo: ectodermo, mesodermo y endodermo, así como células de la línea germinal. Las primeras células madre pluripotentes se obtuvieron a partir de teratocarcinomas, el cual es un tumor de origen germinal. Posteriormente, la obtención de estas células a partir de blastocitos de ratón y de humanos, demostró que las células madre pluripotentes pueden ser cultivadas *in vitro* como líneas celulares inmortalizadas no transformadas (Martin, 1981; Thomson et al., 2009).

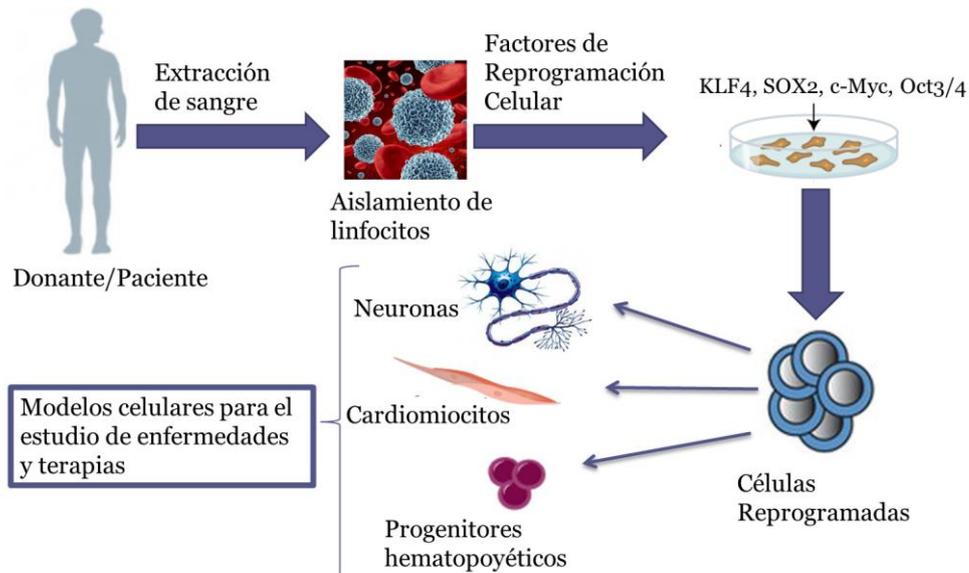


Figura I.9.- Obtención y diferenciación de las iPSCs. Las iPSCs se generan mediante la desdiferenciación de células somáticas adultas que expresan de forma ectópica los factores de reprogramación celular. Una vez realizada la reprogramación celular y comprobado su estado pluripotente, se puede realizar la diferenciación de esas células hacia diferentes tipos celulares. Finalmente, esta diferenciación hacia diferentes linajes constituye una serie de modelos celulares para el estudio de enfermedades y el desarrollo de terapias.

Se han obtenido diferentes tipos de células madre pluripotentes partiendo de diversas fuentes: células madre embrionarias, células epiblasticas, células germinales embrionarias, células progenitoras de gametos y células de carcinoma embrionario.

La reprogramación hacia la pluripotencia se produce cuando una célula somática adulta se convierte en una célula pluripotente (Stadtfield, Hochedlinger, Stadtfield, & Hochedlinger, 2010). El desarrollo de la reprogramación celular ha atraído la atención de los investigadores, ya que las células reprogramadas y la capacidad para reprogramar estas células constituyen una nueva fuente para terapias en la medicina regenerativa, así como una fuente de diferentes modelos celulares sobre el que estudiar diferentes enfermedades (Figura I.9).

1.6.2.- La reprogramación de diferentes linajes celulares hacia células pluripotentes inducidas (iPSCs) usando factores de transcripción específicos

La reprogramación de células diferenciadas hacia células pluripotentes inducidas (iPSCs) que sean, tanto morfológica como funcionalmente idénticas a las células embrionarias pluripotentes, es uno de los mayores hitos científicos de los últimos años (*Nat Methods Vol. 7, "Method of the year 2009"*; Premio Nobel en Medicina y Fisiología 2012). Esta tecnología permite obtener, mediante la expresión de factores de transcripción específicos, líneas de células pluripotentes de cualquier individuo a partir de células diferenciadas de su propio organismo (fibroblastos, células sanguíneas, queratinocitos, melanocitos, etc.). De esta forma, se han abierto las puertas hacia la medicina regenerativa personalizada. Otro aspecto importante de las iPSCs, es que permiten caracterizar los mecanismos subyacentes del establecimiento y mantenimiento de la pluripotencialidad. Estas células permiten determinar de manera funcional cuales son los genes que determinan que una célula sea pluripotente o cómo afecta la presencia de otros genes coadyuvantes.

Como se ha mencionado anteriormente, el laboratorio del Dr. Yamanaka consiguió reprogramar fibroblastos de ratón hacia iPSCs mediante la expresión de 4 factores de transcripción: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC* (abreviado, usando las siglas de los 4 genes: OKSM). A partir de este trabajo se sucedieron gran número de publicaciones en las se modificaban los factores utilizados originalmente. También se han producido modificaciones respecto al método de expresión de los diferentes factores de reprogramación. Es más, una vez que se constató que la reprogramación hacia la pluripotencia implicaba el silenciamiento de los transgenes, se comenzaron a emplear métodos de expresión transitorios mediante el uso de vectores. Los vectores que se emplean en la actualidad son: vectores retrovirales, vectores lentivirales, virus Sendai, vectores basados en el transposón *piggyBac*, vectores plasmídicos episomales e incluso de introducen en las células ARNs sintéticos de forma directa (Nishimura et al., 2011; Okada & Yoneda, 2011; Warren et al., 2010; Woltjen et al., 2009).

1.6.3.- Fases de la reprogramación hacia iPSCs

Durante el proceso de reprogramación de células adultas hacia iPSCs, las células pasan por una serie de formas intermedias más o menos reversibles. Mediante la utilización de un sistema de vectores regulables con doxiciclina, se ha conseguido monitorizar el proceso de reprogramación y analizar las fases más importantes por las pasan las células hasta convertirse en iPSCs maduras (Brambrink et al., 2008; Stadtfeld, Maherali, Breault, & Hochedlinger, 2008). En términos generales, la reprogramación se puede dividir en tres fases (Brambrink et al., 2008; Mikkelsen et al., 2008; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Stadtfeld et al., 2008). Una primera fase denominada fase de iniciación, donde las células que están sufriendo la reprogramación pueden volver al estado inicial si se silencia la expresión de los factores exógenos (Samavarchi-Tehrani et

al., 2010). Una fase de maduración, en la que las células que se están reprogramando adquieren la capacidad de expresar genes de pluripotencia tempranos. Y una última fase denominada fase de estabilización, en la cual ya se expresan los genes tardíos de pluripotencia. Esta fase conduce a las células en reprogramación hacia iPSCs adultas estables.

OBJETIVOS

2.- Objetivos

En esta Tesis Doctoral, nos hemos propuesto como objetivo principal identificar la causa del defecto congénito de base genética que podría explicar el cuadro clínico presentado por la paciente. Para poder abordar este objetivo, nos proponemos, en primer lugar, realizar estudios, tanto moleculares como genéticos, que nos permitan identificar la causa de los síntomas presentados por la paciente a lo largo de su vida. Una vez identificada la causa, nos centraremos en el establecimiento de un modelo celular obtenido mediante una biopsia de piel de la paciente, ya que se trata de un método mínimamente invasivo y prácticamente indoloro. Finalmente, estableceremos un modelo basado en la reprogramación de células de la propia paciente para el estudio de la evolución en la diferenciación hacia diferentes linajes celulares. Una vez establecidos los modelos celulares, y de cara hacia una posible aplicación clínica, podremos desarrollar una estrategia terapéutica que permita corregir las alteraciones celulares que se encuentren.

A continuación, se enumeran los objetivos generales y específicos de este trabajo:

2.1.- Identificación de la causa genética de la sintomatología presentada por la paciente.

- Realización de un estudio genético de la enfermedad mediante la secuenciación del exoma de la paciente con el fin de identificar mutaciones *de novo* que expliquen el fenotipo de la paciente.

2.2.- Establecimiento y caracterización de un modelo celular primario a partir de una biopsia de piel de la paciente.

- Aislamiento, cultivo y caracterización de queratinocitos de la epidermis de piel.
- Aislamiento, cultivo y caracterización de fibroblastos de la dermis de piel.

2.3.- Realización de un estudio inmunofenotípico a partir de la muestra de piel de la paciente obtenida mediante biopsia.

2.4.- Estudio de los efectos celulares *in vitro* y de una estrategia terapéutica que permita corregirlos.

2.5.- Estudio de la enfermedad mediante un modelo de ratón para el defecto congénito causante de la enfermedad.

2.6.- Establecimiento de un modelo de células madre pluripotentes (iPSCs) a partir de células mononucleares de sangre periférica de la paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- Materiales y Métodos

3.1.- Cultivo celular

3.1.1.- Muestras biológicas

Para la secuenciación del exoma y para la generación de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*) se obtuvieron muestras de sangre periférica de la paciente y de sus progenitores.

Para el desarrollo del modelo celular de queratinocitos y fibroblastos se realizó una biopsia de piel y de mucosa oral a la paciente. Posteriormente se aislaron queratinocitos de la mucosa oral, queratinocitos de piel y fibroblastos.

Tanto la obtención de sangre periférica como las biopsias de piel y de mucosa oral se realizaron con el consentimiento informado de los padres de la paciente. Todas las muestras biológicas se procesaron tras la obtención de los permisos éticos solicitados, aprobados y consentidos por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria. De esta forma se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos.

En los modelos celulares de queratinocitos de piel y fibroblastos, se utilizaron como control células procedentes de biopsias de pacientes sanos. Estas muestras fueron obtenidas gracias al Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander, previo consentimiento escrito de los pacientes, y tratadas posteriormente de forma anónima.

3.1.2.- Aislamiento de queratinocitos de piel y fibroblastos

Para el aislamiento de queratinocitos de piel se partió de biopsias de piel según el protocolo descrito anteriormente (Rheinwald, 1989). La muestra se conservó en frío y humedecida con suero fisiológico desde el momento de su extracción. Se lavó la piel en PBS 1X sin calcio ni magnesio y se eliminó la mayor parte de la dermis con ayuda de un bisturí. Posteriormente se fragmentó la muestra en trozos más pequeños y se hizo un par de lavados con PBS 1X frío. Para poder separar la epidermis de la dermis, el tejido se incubó con 2,5 mg/ml de dispasa (Roche). A la dispasa se le añadieron los siguientes antibióticos: 0,5 µg/ml de anfotericina B (Lonza) y 100 U/ml de penicilina/estreptomocina (Lonza). Se dejó la muestra en esta solución enzimática durante 14-16 horas a una temperatura de 4°C. Tras esta incubación, se lavó el tejido nuevamente con PBS 1X frío y se separó la epidermis de la dermis con ayuda de unas pinzas estériles. La epidermis se mantuvo en PBS 1X para evitar que se secase. Posteriormente, la epidermis se fragmentó en trozos más pequeños y se realizaron un

par de lavados con PBS 1X-EDTA. A continuación, se incubó en una solución compuesta en proporción 3:1 v/v por PBS-EDTA y tripsina 1X (Gibco) y se agitó durante 15 minutos a 37°C. Tras esta incubación, se recogió el sobrenadante con medio FAD completo (Tabla M.1) y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet que contiene los queratinocitos, fue suspendido en medio FAD completo. A continuación, se sembraron los queratinocitos sobre una capa de feeders en placas de cultivo de 100 milímetros de diámetro a una densidad de 4×10^5 células por placa. De esta forma se fue amplificando el cultivo hasta poder crear un stock de células en los pases más tempranos y almacenarlas en nitrógeno líquido.

El aislamiento de los fibroblastos también se llevó a cabo a partir de la biopsia de piel. La muestra se disgregó con una solución enzimática formada por tripsina 1X, 2,5 mg/ml de colagenasa (Roche) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 0,5 µg/ml anfotericina B. Se incubó junto a esta solución enzimática a 37°C en rondas de 15 minutos. Después de la primera incubación se desechó el sobrenadante. En las siguientes rondas, el sobrenadante se recogió en medio Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Lonza) y fue renovándose la solución enzimática. Se realizaron tantas rondas como fueron necesarias hasta que el tejido se disgregó casi en su totalidad. Se centrifugó el sobrenadante recogido durante 5 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y los fibroblastos se suspendieron en medio DMEM + 10% FBS + 5% L-glutamina. Se sembraron en placas de cultivo de 100 milímetros de diámetro y se amplificó el cultivo hasta poder crear un stock de células en pases tempranos que fueron almacenadas en nitrógeno líquido.

3.1.3.- Crecimiento, mantenimiento y expansión de cultivos celulares de queratinocitos de piel

Los queratinocitos primarios se cultivaron en co-cultivo sobre una placa de fibroblastos de ratón J2-3T3 (Rheinwald, 1989). Estos fibroblastos se trataron con 6 µg/ml mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante dos horas con el objetivo de evitar que sigan dividiéndose cuando son cultivados con los queratinocitos. Los fibroblastos aportan a los queratinocitos primarios el soporte necesario para su desarrollo (feeders). Una vez mitomizados, los feeders se levantaron mediante una incubación de 5 minutos con una solución de PBS 1X-EDTA y tripsina 1X en relación 2:1 v/v. A continuación, se bloqueó la tripsina añadiendo medio FAD completo.

Tabla M1. Composición del medio de cultivo de los queratinocitos primarios.

Componentes del medio	Casa Comercial	Concentración final
DMEM	Lonza	3x
HAM's-F12	Lonza	1x
FBS	Lonza	10%
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich	0,5 µg /ml
EGF	Sigma-Aldrich	0,01 ng/ml
Toxina colérica	Sigma-Aldrich	0,08 ng/ml
Adenina	Sigma-Aldrich	
Insulina	Sigma-Aldrich	5 µg/ml
L-glutamina	Lonza	2 mM
Sodio Piruvato	Lonza	0,75 mM
Penicilina/Estreptomina	Lonza	100 U/ml

Una vez añadidos los feeders, se añadieron los queratinocitos primarios a la densidad celular deseada.

Los queratinocitos se crecieron a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂ y humedad del 95-99%. El medio de cultivo se cambió tres veces por semana hasta llegar a pre-confluencia, es decir, hasta llegar aproximadamente a un 80% de la placa cubierta.

Cuando los queratinocitos alcanzaron la pre-confluencia, se procedió a levantarlos, tanto para sembrar los diferentes experimentos como para expandir el cultivo o continuar con su mantenimiento. Primero se lavaron las placas con PBS 1X-EDTA para eliminar los feeders. Para ello, se añadió el PBS 1X-EDTA y se realizó una breve incubación de un par de minutos a 37°C junto con un pipeteo sobre los queratinocitos para limpiar bien el cultivo de feeders. Se recogió el sobrenadante, eliminando de esta forma los feeders en suspensión y a continuación se comprobó al microscopio que efectivamente solo quedaban queratinocitos en la placa de cultivo. Para levantar las células, se añadieron PBS 1X-EDTA y tripsina 1X en relación 2:1 v/v. Se realizó una incubación de 10-15 minutos a 37°C. Se comprobó que los queratinocitos estaban en suspensión y se procedió al bloqueo de la tripsina suspendiendo las células en medio FAD completo. Este medio, al contener suero en su composición, produce el cese de la actividad enzimática de la tripsina. Dado que los queratinocitos en suspensión forman agregados, se disgregaron bien con ayuda de la pipeta. A continuación, se cogieron 20 µl para contar el número de células en una cámara de Neubauer y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se suspendieron los queratinocitos en el volumen necesario de medio FAD completo para tenerlos a la concentración de 1x10⁶ células/ml. Para continuar con el mantenimiento del cultivo, se sembraron a una densidad de 4x10⁵ células en cada placa de cultivo de 100 milímetros de diámetro.

3.1.4.- Crecimiento, mantenimiento y expansión de cultivos celulares de fibroblastos

Una vez aislados los fibroblastos de piel, se procedió directamente a su cultivo en medio DMEM + 10% FBS + 5% L-glutamina en placas de cultivo de 100 milímetros de diámetro. Se crecieron a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂ y humedad del 95-99%. El medio de cultivo se cambió cada tres días aproximadamente hasta que los fibroblastos llegaron a pre-confluencia (80% de la placa cubierta).

Cuando el cultivo de fibroblastos llegó a pre-confluencia, se procedió a levantar las células para continuar expandiendo el cultivo o para sembrar los experimentos correspondientes. Para ello, se realizó un lavado con PBS 1X-EDTA para añadir a continuación PBS 1X-EDTA y tripsina 1X en proporción 2:1 v/v. Se procedió a una incubación de 5 minutos a 37°C. Se añadió medio de cultivo DMEM + 10% FBS para recoger las células y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Antes de centrifugar se cogieron 20 µl para contar el número de células en una cámara de Neubauer. Una vez centrifugadas, se desechó el sobrenadante y los fibroblastos de suspendieron en la cantidad de DMEM + 10% FBS necesaria para tener las células a una densidad de 1x10⁶ células/ml.

3.1.5.- Generación de células madre pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs*)

Se obtuvieron dos muestras de sangre periférica, una de las muestras perteneciente a nuestra paciente. La otra muestra se extrajo de su progenitora, la cual se usó como individuo control en el desarrollo de estos experimentos. Ambas muestras se enviaron al laboratorio del Dr. Pedro J. Real Luna en Genyo (Granada). Mediante gradiente de Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare), se purificaron las células mononucleares de la paciente y de su progenitora. Estas células se crecieron en medio de cultivo StemSpan™ SFEM (StemCell Technologies) suplementado con la concentración apropiada de citoquinas (Lopez-Onieva et al., 2016, 2017). A continuación, se pasaron a placas de cultivo recubiertas de fibronectina (BD BioCoat™) y fueron expuestas a las partículas virales generadas según el protocolo de transducción, empleando el vector de reprogramación comercial basado en los virus Sendai (SeV) CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming kit, (Life Technologies, Invitrogen). Posteriormente, las células transducidas se mantuvieron en medio StemSpan™ SFEM (StemCell Technologies) en ausencia de citoquinas y sobre una capa de células madre mesenquimales irradiadas (ihMSCs) (Inbiobank). Seis días después de la transducción, se adaptaron las células al medio de células madre pluripotentes (PSC) (Lopez-Onieva et al., 2016, 2017). Las células reprogramadas se mantuvieron en estas condiciones hasta su estabilización. Además, las iPSCs también se han adaptado a unas condiciones de cultivo libre de feeders. Para ello se sembraron sobre Matrigel (Corning BD) con el medio de composición definida Essential 8 (E8). La identificación, selección y caracterización de

las colonias emergentes se llevó a cabo según el protocolo descrito con anterioridad (Lopez-Onieva et al., 2016, 2017; Ramos-Mejía et al., 2012).

3.1.6.- Crioconservación de las células

Se congeló un porcentaje de las células de cada uno de los modelos celulares obtenidos: queratinocitos y fibroblastos de piel e iPSCs. Con los queratinocitos y los fibroblastos se realizó el siguiente protocolo: se congelaron un máximo de 1×10^6 células por vial en un 90% de FBS y posteriormente se añadió por vial un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) de forma lenta con agitación suave. Las iPSCs generadas se congelaron a una concentración de 1×10^6 células por vial en medio E8 pre-enfriado y suplementado con un 10 % de DMSO. Los viales criogénicos se mantuvieron al menos durante 24 horas en soportes de congelación con isopropanol a -80°C . Posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.1.7.- Tratamiento con NAP

Para el estudio de una estrategia terapéutica frente a los efectos celulares producidos por el Síndrome ADNP, utilizamos el péptido NAP, cuya secuencia de aminoácidos es NAPVSIPQ (GenScript) en los modelos celulares establecidos. Para ello se administró 100 nM de NAP a los queratinocitos de piel, 600 nM a los fibroblastos de piel humanos y a los progenitores neurales y 180 nM a los fibroblastos de ratón. La duración del tratamiento fue variable dependiendo de la duración de cada experimento. Este péptido se añadió desde el momento en el que se sembraron las células, renovándose su administración en cada cambio de medio (cada tres días aproximadamente).

3.2.- Técnicas moleculares

3.2.1.- Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se utilizó el reactivo TRIZOL (Invitrogen), basado en el protocolo de extracción fenólica descrito por Chomczynski (1987). Las células recogidas fueron lisadas en 1 mililitro de TRIZOL. A continuación, se añadieron 200 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló mediante agitación. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 18 minutos a 12.000 rpm a 4°C . Tras la centrifugación se recuperó la fase acuosa superior, que es la que contiene el RNA, y se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 500 μl de isopropanol para la precipitación de dicho ARN. Tras mezclar por agitación, se incubó durante 1 hora a -20°C y se centrifugaron las muestras 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C . El ARN precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% incubándolo 1 hora a -20°C y a continuación centrifugando las muestras durante 10 minutos a 7.500 rpm a 4°C . Tras dejar secar el

pellet obtenido, se suspendió con H₂O DEPC (H₂O con un 0,1% de dietilpirocarbonato que inhibe las RNAasas) (Sigma) en un volumen variable según el tamaño del pellet obtenido. La concentración de ARN total se cuantificó mediante dos métodos diferentes: mediante absorción espectrofotométrica (Nanodrop TMND-1000), y mediante fluorimetría (Qubit Fluorometer, Invitrogen). En las concentraciones medidas con el Nanodrop, los ratios de absorbancia 260/280 nm y 230/260 nm fueron utilizados como criterio de calidad de las muestras. Todas las muestras obtenidas de ARN fueron conservadas a -80°C hasta su utilización para minimizar la degradación.

3.2.2.- RT-PCR Semicuantitativa

Para la obtención del ADN complementario (ADNc) a los ARN mensajeros (mRNA) obtenidos de la extracción, se realizó un protocolo de retrotranscripción (RT). Partiendo de la cantidad de 1-2 µg de RNA total de cada muestra se diluyeron en un volumen total de 13 µl de una mezcla formada por la muestra de ARN, 500 pmol de oligonucleótidos de secuencia aleatorio denominada "Random primers" (Promega), junto con 0,2 mM dNTPs (GE Healthcare) y H₂O DEPC para llegar al volumen final. Se calentaron durante 5 minutos a 65°C para la desnaturalización de las hebras de ARN e inmediatamente se enfriaron en hielo para evitar la renaturalización. A continuación, se añadió a esa mezcla de reacción 1 mM de ditioneitol (DTT, Invitrogen), 5 U de inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen) y 10 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) y un buffer tampón 1X (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂) hasta un volumen final de 20 µl por reacción. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C, y finalmente 15 minutos a 70°C para la inactivación de la enzima. Todos los cDNA sintetizados se conservaron a -20°C hasta su amplificación por PCR.

Para la reacción de amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se partió de 1 µl (cuya concentración es 1 µg) de cDNA, junto a un tampón de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 0,1 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada primer del gen, 2,5 U de Taq Polimerasa (KapaBiosystems) y H₂O destilada hasta un volumen final de 50 µl por reacción. Para esta reacción de PCR se emplearon las siguientes condiciones: fase de desnaturalización (1 ciclo) a 95°C durante 5 minutos, seguido de una fase de amplificación (entre 30 y 35 ciclos) con un paso de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos; otro paso de emparejamiento a 55-65°C durante 30-45 segundos (variable según el tamaño del amplicón y las T_m de los primers) y un tercer paso de extensión a 72°C durante 30 segundos; y la fase de extensión final (1 ciclo) a 75°C durante 7 minutos. Para detectar y cuantificar los productos de cDNA amplificados, se sometieron a una electroforesis (90-100 mV) en gel de agarosa al 2% para separarlos en función de su tamaño. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio al 1-2% en tampón TAE 1X (Roche) y se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador (Bio-Rad). Las imágenes se adquirieron mediante una cámara del sistema utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad).

3.2.3.- RT-PCR Cuantitativa

Para el análisis comparativo de la expresión génica se utilizó también la amplificación mediante PCR cuantitativa (qPCR). Para cada reacción en placa de 96 pocillos, se tomaron 100 ng de cada ADNc obtenido mediante retrotranscripción, 0,4 μ M de cada primer del gen de interés, 12,5 μ l del reactivo comercial 0,5X de Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), necesario para la amplificación, y H₂O hasta un volumen final de 25 μ l. Este reactivo comercial contiene un fluoróforo que se unirá al ADN de doble hebra para poder detectarlo, dNTPs, un tampón para la reacción y la enzima ADN polimerasa AmpliTaq Gold. Esta enzima es una forma modificada químicamente de la AmpliTaq ADN polimerasa, que mantiene a la enzima inactiva hasta que se somete a elevadas temperaturas, 10 minutos a 95°C, evitando de este modo la hibridación inespecífica de los primers. La reacción de PCR se llevó a cabo en la plataforma de Applied Biosystem 7000 Real-Time PCR System usando las condiciones estándar consistentes en un primer paso de 2 minutos a 60°C, seguido de 10 minutos a 95°C para que se produzca la activación de la enzima, y a continuación, 40 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización de 15 segundos a 95°C y de otro paso de emparejamientos y extensión de 1 minuto a 60°C en cada ciclo.

Los resultados fueron analizados mediante el software específico del sistema ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems), que permitió procesar la fluorescencia emitida y obtener un valor Ct (ciclo umbral o *threshold cycle*) para cada muestra. Este valor se define como el ciclo de la PCR en el cual se detecta una señal de fluorescencia por encima de la señal basal establecida. La formación de los productos específicos fue comprobada mediante el análisis de las curvas de disociación, siendo un pico único cuando se trata de la amplificación de nuestro gen de interés. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se tomó la expresión del gen de β -actina y G6PD como control de carga interno. Para cuantificar las variaciones de expresión entre las muestras se realizaron los siguientes cálculos:

1. Cálculo del valor Δ Ct para cada muestra (Δ Ct = Ct gen problema – Ct gen control).
2. Cálculo del valor $\Delta\Delta$ Ct ($\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct muestra – Δ Ct control de la cinética). El estado control de las cinéticas se consideró dependiendo de cada cinética como el estado de las células sin tratamiento y las células con tratamiento. Asimismo, las muestras objeto de estudio fueron aquellas sometidas al tratamiento y que mostraban una sobreexpresión y una inhibición de los genes de interés.
3. Determinación del nivel de expresión o FC (fold change) como el valor $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

3.2.4.- Oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos específicos tanto para el caso de la PCR convencional como la qPCR, se utilizó el programa Primer-BLAST

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

manteniendo los parámetros estándar. También se consultaron las bases de datos del NIH y referencias bibliográficas. Una vez diseñados, fueron verificados en el website BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comprobar que al realizar la PCR cuantitativa, no se amplificase ningún producto no específico. En todos los casos, la región amplificada incluyó dos exones diferentes para evitar la contaminación de DNA genómico.

En el caso de la PCR alelo-específica para verificar la mutación encontrada, se diseñó el juego de oligonucleótidos de forma específica con la variante encontrada para que se amplificasen tanto el alelo wild-type como el alelo mutado.

El listado de oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCRs, con su secuencia correspondiente y el tamaño del amplicón, se detallan en la tabla M.2. La síntesis química de los oligonucleótidos fue realizada por Metabion Internacional AG (Alemania).

Tabla M.2.- Parejas de oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR y qPCR.

Gen	Secuencia oligonucleótidos (5´-3´)	Tamaño de amplicón
β -actina	F - GCGGGAAATCGTGCGTGACATT R - GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG	232 pb
ADNP wt	F - CACCTGTGAAGCGCACTTAC R - GGGATAGGGCTGTTTGTGAA	206 pb
ADNP mut	F - CACCTGTGAAGCGCACTTAA R - GGGATAGGGCTGTTTGTGAA	206 pb
KRT1	F - CCAGCCAGAGTAGGACCAGT R - TGCAGCAAACAAGGAAATG	150 pb

3.3.- Técnicas celulares

3.3.1.- Citometría de flujo

3.3.1.1.- Expresión de marcadores de diferenciación en queratinocitos

Para el análisis de los marcadores de diferenciación queratina 1 e involucrina, se recogieron las células y se fijaron según diferentes procedimientos en función del marcaje que se quería realizar. Todos los anticuerpos primarios usados se describen en la tabla M.3.

En el caso de la queratina 1, las células se fijaron en etanol al 70%. Para ello, se lavaron 2 veces en PBS frío centrifugando a 1.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se añadió el etanol en proporción 1 ml de etanol al 70% por cada 1×10^6 células. Posteriormente, y para que las células quedaran perfectamente fijadas, se las mantuvo durante un tiempo mínimo de 30 minutos a 4°C. En este punto las células se preservaron a 4°C hasta el momento de su marcaje. Para marcar los queratinocitos, el primer paso

fue lavar 2 veces las células con PBS 1X + 0,5% FBS (Lonza) centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras el segundo lavado, se añadió el anticuerpo primario (queratina 1), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. En todos los marcajes con anticuerpos, además de nuestro anticuerpo de interés, se realizó un marcaje con un anticuerpo negativo que nos permitiese determinar el fondo del marcaje. En el caso del marcaje con queratina 1, como anticuerpo negativo se utilizó suero de conejo. Transcurrida la hora de incubación, se realizaron 2 lavados con un tampón de lavado. Una vez realizados los 2 lavados, se procedió al marcaje de las células con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Una vez añadido el anticuerpo secundario, se incubó durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, se hicieron 2 lavados más con el tampón de lavado centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se suspendieron las células en PBS 1X y se conservaron a 4°C en oscuridad hasta el momento de pasarlas por el citómetro.

En el caso del marcaje con involucrina, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 3,7%. Se añadió a las células en proporción de 500 µl de paraformaldehído al 3,7% por cada 1×10^6 células. Las células se suspendieron en 450 µl de PBS 1X por cada 1×10^6 células. Se preservaron las células en este punto hasta el momento del marcaje con el anticuerpo. Cuando se marcaron los queratinocitos con involucrina, lo primero que se hizo fue permeabilizar las células. Para ello, se añadió sobre las células saponina al 0,3 % (Sigma-Aldrich). Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con PBS 1X y se centrifugaron las muestras a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se procedió con el marcaje de los anticuerpos primarios: anti-involucrina (Sigma-Aldrich) y anti-mouse IgG como anticuerpo negativo. Para añadir los anticuerpos a la concentración adecuada, estos se diluyeron en un buffer formado por PBS y saponina al 0,1%. Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras este periodo, se realizaron dos lavados con una solución de lavado compuesta por 0,1% de saponina y 5% de FBS en PBS 1X. Los lavados se realizaron mediante centrifugaciones de 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras el segundo lavado, se procedió a marcar los queratinocitos con el anticuerpo secundario, en este caso, Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se hicieron dos lavados con la solución de lavado centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se suspendieron las células en PBS y se conservaron en oscuridad a 4°C.

3.3.1.2.- Análisis de apoptosis mediante detección de Anexina V

Para el análisis de la adhesión celular en fibroblastos, realizamos un estudio de la apoptosis para ver si se producía muerte celular. Este estudio lo realizamos mediante citometría de flujo. Tras mantener los fibroblastos durante diferentes tiempos en cultivo, y con y sin el tratamiento con NAP, se lavaron las células con PBS 1X. Tras este lavado, se realizó el marcaje con AnexinaV mediante el kit de detección de apoptosis PE

Anexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen). La tinción con Anexina junto con la de 7AAD (7-amino-actinomycin D) permite diferenciar mediante citometría las células vivas (negativas para ambos marcajes), células en apoptosis temprana (se marcan con AnexinaV, pero son negativas para el 7AAD) y las células muertas por procesos diferentes a la apoptosis (positivas para 7AAD y negativas para AnexinaV). Como controles de estos experimentos, se utilizaron fibroblastos sanos, y fibroblastos tratados con quimioterápicos que fueran positivos para apoptosis.

Todos los estudios de citometría de flujo se realizaron en la plataforma FAC's Canto (BD Biosciences) y se contó con el soporte del personal técnico responsable del Servicio de Citometría del Instituto de Investigación Sanitaria Marqués de Valdecilla (Idival) y de la Facultad de Medicina (Universidad de Cantabria). Todas las muestras fueron suspendidas y filtradas a través de filtros con un tamaño de poro de 70 μm para evitar la presencia de agregados. En cada experimento, se adquirieron un total de 10.000 eventos por cada muestra. Finalmente, es análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el empleo del software FACSDIVA (BD Biosciences).

3.3.2.- Ensayo de clonogenicidad

Para los ensayos de clonogenicidad, se sembraron las células a baja densidad (2.500 células por pocillo) en co-cultivo con *feeders*. Se sembraron por triplicado en placas de seis pocillos de 35 mm de diámetro. Tras 10-12 días de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS 1X frío, y se fijaron las células con formaldehído al 3,7 % (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se realizó un lavado con PBS 1X frío y se tiñeron las células con solución Rodamina-Azul del Nilo. Esta solución está compuesta por 1 % Rodamina B (Sigma-Aldrich), 1 % Nile Blue (Sigma-Aldrich) y agua destilada (Jones & Watt, 1993). Posteriormente, se realizaron entre 2 y 3 lavados homogéneos con agua destilada.

La cuantificación de los ensayos de clonogenicidad se empleó un microscopio óptico de transmisión acoplado a un espectrógrafo. De esta forma se cuantificó la densidad celular de cada pocillo, midiendo la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda que van desde los 400 a los 700 nm. Se realizó un barrido a lo largo de todo el pocillo con el objetivo de cubrir toda la superficie para conseguir cuantificar la absorbancia total del pocillo. Para ello, se midió la absorbancia de cada longitud de onda para posteriormente, dividir la diferencia de las longitudes de onda mayor y menor. El resultado obtenido, es la absorbancia media del pocillo. A continuación, se sumaron las absorbancias medias de cada posición del barrido y se dividió entre el número total de posiciones del barrido, de forma que se obtuvo la absorbancia total.

3.3.3.- Ensayos de proliferación celular

Para realizar los ensayos de proliferación en queratinocitos, se sembraron 70.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio FAD completo realizando triplicados en cada experimento. En los casos necesarios, se añadió en péptido NAP. Se realizó la cuantificación a diferentes tiempos: 5, 7 y 9 días. Para ello, primero se eliminaron los *feeders* que aún permanecían en cultivo, para a continuación, recoger las células mediante una mezcla compuesta por PBS 1X-EDTA más tripsina en proporción 2:1 v/v. Finalmente se procedió con el conteo de las células con la ayuda de la cámara de Neubauer. Los resultados se expresan como el número medio de células contadas en al menos tres experimentos independientes \pm SD.

En el caso de los ensayos de proliferación de fibroblastos, se sembraron 2.500 células por pocillo en microplacas capaces de detectar el cambio de potencial (E-plate 16). Mediante el empleo de estas placas, se monitorizó la proliferación celular durante un periodo de tiempo de 120 horas mediante la tecnología xCELLigence DP (ACEA Biosciences), registrando los datos cada hora. Los resultados se expresan como el cambio de potencial detectado en al menos tres experimentos independientes \pm SD.

3.3.4.- Inmunofluorescencia

3.3.4.1.- Inmunofluorescencia en células

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de cristal redondos, se fijaron y se tiñeron con diferentes anticuerpos primarios, descritos en la tabla M.3. El método de fijación se escogió en función de la solubilidad de los antígenos a estudiar: metanol a -20°C durante 10 minutos o formaldehído al 3,7 % durante 10 minutos y posterior permeabilización con metanol a -20°C durante 5 minutos. Tras realizar la fijación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Se realizó un tercer lavado, pero en esta ocasión con PBS-Tween-20 0.05 %. Posteriormente se procedió con el marcaje mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario a la concentración adecuada (Tabla M.3). Se realizó la incubación con el anticuerpo primario durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron otros tres lavados, volviendo a ser el último con PBS 1X-Tween-20 0.05 %. Se incubaron las células con el anticuerpo secundario correspondiente. Estos anticuerpos secundarios portan un fluorocromo que es con el que posteriormente se detectara, mediante fluorescencia, la presencia de la proteína diana del anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario se llevó a cabo durante una hora en cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente. En el caso de realizar la inmunodetección de varias proteínas, se incubaron los anticuerpos primarios de forma conjunta, y se revelaron con una mezcla de anticuerpos secundarios específicos para cada anticuerpo primario con diferentes fluorocromos. Los inmunomarcajes fueron contrastados durante 10 minutos con 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich). Las muestras se montaron con el medio de montaje Prolong Gold Antifade (Life Technologies) y se

analizaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager D2 con cámara Axio Cam MRm fuente de fluorescencia HPX 120C Kübler Codix.

La cuantificación de las células inmunorreactivas para los diferentes marcajes, se realizó con la ayuda del programa informático ImageJ (NIH). Se procedió al recuento de un número representativo de células de cada condición experimental, siendo al menos 4 campos diferentes tomados al azar en la preparación e intentado cuantificar aproximadamente 100-200 células por campo. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas respecto a células totales. Los resultados se representan como el porcentaje de células medio \pm SD.

3.3.4.2.- Inmunofluorescencia en parafina

El servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla se encargó de embeber en parafina y realizar las secciones de piel a partir de la biopsia de piel realizada a la paciente. Por tanto, una vez obtenidas las secciones de piel embebidas en parafina, se desparafinaron y se hidrataron dichas secciones en diluciones seriadas decrecientes de alcoholes: 15 minutos en estufa a 55 °C, 3 pasos de 5 minutos cada uno en xilol (Panreac), 3 pasos de 5 minutos cada uno en etanol al 100 %, 1 paso de 5 minutos en etanol al 95 %, un paso de 5 minutos en etanol al 50 % y finalmente un paso de 5 minutos en agua destilada. El proceso de recuperación antigénica se llevó a cabo mediante un proceso térmico en tampón citrato 0,01 M pH6 (citrato trisódico dihidratado) (Merck) durante 15 minutos en ebullición en microondas. A continuación, se realizaron varios lavados en agua destilada. Posteriormente se bloqueó la auto-fluorescencia de la parafina mediante la incubación de las secciones en cloruro de amonio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación se realizó el bloqueo de las secciones para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Para ello, se bloqueó el tejido con una solución al 1 % de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich), y 8 % de suero bovino fetal en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de 5 minutos con PBS-Tween 0,05 % antes de incubar con el anticuerpo primario durante 12 horas en cámara húmeda a 4 °C. Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno para, a continuación, realizar un último lavado con PBS-Tween 0,05 %. Se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. Finalmente, se realizó la contratinción de los núcleos y el montaje, visualización y análisis de las muestras al igual que en el apartado 3.3.6.1. Los anticuerpos empleados aparecen en la tabla M.3.

3.4.- Estudios con animales de experimentación

3.4.1.- Modelo animal para el estudio de piel

Todos los estudios de piel realizados con el modelo murino han sido realizados en las instalaciones de la Universidad de Tel Aviv con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Tel Aviv y el Ministerio de Salud de Israel. Para la redacción de los materiales y métodos empleados en esta parte, la doctoranda que firma esta Tesis ha contado con la ayuda y colaboración de un miembro del laboratorio de la Dra. Gozes, Oxana Kapitansky. Se cruzaron ratones heterocigotos para la expresión de *Adnp* con ratones ICR. Los ratones heterocigotos obtenidos se mantuvieron, junto con sus compañeros de camada, con un ciclo de 12 horas de luz combinado con 12 horas de oscuridad hasta los dos meses de edad (Malishkevich et al., 2015; Vulih-Shultzman et al., 2007). Estos animales dispusieron de comida y agua sin limitaciones.

3.4.1.1.- Administración y tratamiento del péptido NAP al modelo de ratón transgénico

Para la realización de la administración del péptido NAP, dicho péptido se disolvió en una solución salina compuesta por 7,5 mg/ml de cloruro sódico, 1,7 mg/ml de ácido cítrico monohidrato, 3 mg/ml de fosfato disódico dihidratado y 0,2 mg/ml de una solución de cloruro de benzalconio al 50 % (Alcalay, Giladi, Pick, & Gozes, 2004). De esta forma se administraron 0,5 µg de NAP disueltos en 5 µl de esta solución salina por vía intranasal. La administración se realizó de forma diaria, durante 5 días a la semana durante 6 semanas. Los ratones empleados como control fueron tratados con 5 µl de placebo de la misma manera y con la misma duración. Los ratones control (no tratados) se mantuvieron hasta la edad de 4,5 meses.

3.4.1.2.- Establecimiento del modelo celular de fibroblastos a partir de ratones transgénicos y tratamiento con NAP

Los fibroblastos empleados en los cultivos primarios *in vitro* se obtuvieron a partir de las puntas de las colas de ratones hembra heterocigotas para la expresión de *Adnp*. Como control, se utilizaron fibroblastos obtenidos de la misma localización anatómica pero procedentes de hembras con una expresión normal de dicho gen. Estas hembras tenían una edad de 4,5 meses. Las puntas de las colas se incubaron con una solución formada por 1 mg/ml de colagenasa I en medio DMEM suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. La incubación se realizó a 37 °C durante dos horas. Tras la incubación, se añadió un 10 % de suero bovino fetal (FBS) para detener la acción de la colagenasa. Tras realizar una centrifugación, las células fueron suspendidas en medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS y antibióticos. Para la realización de los ensayos de proliferación, se sembraron 5.000 fibroblastos en

cada pocillo en placas de 96 pocillos. En los casos indicados, se añadió el péptido NAP a una concentración de 180 nM. Los datos se registraron mediante la tecnología IncuCyte™, que consiste en un sistema de toma real de imágenes. Los datos fueron registrados cada 3 horas durante 3 días.

Tabla M3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en citometría de flujo (FACS) e inmunofluorescencia (IF). *Anticuerpos negativos. **Los anticuerpos negativos se utilizan a la misma concentración que el anticuerpo primario correspondiente.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Dilución	
			FACS	IF
Queratina 10 (RKS60)	Ratón	Santa Cruz	-	1/100
Ki-67	Conejo	Abcam	-	1/100
Fosfo-histona H3 (Ser10)	Conejo	Santa Cruz	-	1/100
Ciclina E (C-19)	Conejo	Santa Cruz	-	1/200
Ciclina B (GSN1)	Ratón	Santa Cruz	-	1/50
Ciclina A	Ratón	Santa Cruz	-	1/100
Queratina 1 (AF87)	Conejo	Palex	1/60	1/100
Involucrina (SY5)	Ratón	Sigma-Aldrich	1/50	1/100
*IgG	Ratón	Sigma-Aldrich	**	-
*IgG	Conejo	Sigma-Aldrich	**	-
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Especie	Casa comercial	Dilución	
			FACS	IF
Alexa Fluor 488-conjugated	Conejo	Jackson InmunoResearch	1/100	1/100
Alexa Fluor 488-conjugated	Ratón	Jackson InmunoResearch	1/100	1/100
Alexa Fluor 594-conjugated	Conejo	Jackson InmunoResearch	1/100	1/100
Alexa Fluor 594-conjugated	Ratón	Jackson InmunoResearch	1/100	1/100

3.4.1.3.- Inmunofluorescencias en secciones de piel procedentes del modelo de ratón transgénico

Para realizar el análisis del tejido, las muestras de piel de los ratones tratados con el péptido NAP se congelaron. Para ello se embebieron en compuesto OCT, se enfriaron en isopentano que previamente había sido enfriado en nitrógeno líquido y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido. Para realizar las inmunofluorescencias, se realizaron las secciones de piel a partir de estos bloques OCT, dejando descongelar posteriormente los cortes a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la fijación de estas secciones en paraformaldehído al 4 %. Tras

realizar un lavado con PBS, se procedió con la permeabilización del tejido. Para ello, se incubaron las secciones de piel en una solución compuesta por PBS 1X y TritónX-100 al 0,1 % durante 10-20 minutos. Seguidamente se realizó el bloqueo para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios. Para ello, las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución compuesta por 1 % de BSA, 1 % de gelatina, 2,5 % de suero de cabra, 2,5 % de suero de burro, 0,3 % de TritonX-100 en PBS 1X. A partir de este paso, el proceso es el mismo que el descrito en el apartado 3.3.6.2. Los anticuerpos primarios y secundarios son los mismos que los indicados en la tabla M.3.

3.5.- Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de nuestros experimentos se analizaron empleando el programa estadístico SPSS versión 13.0 (SPSS Inc.). El test de t de Student se utilizó para comparar variables continuas, resumidas como medias \pm SD entre dos grupos. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el análisis de varianza ANOVA. El valor de significancia estadística establecido en todos los tests realizados fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1.- Estudio genético de la enfermedad

4.1.1.- Estudios moleculares

Como he mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral, previamente al inicio del trabajo, se le realizaron a la paciente diversos estudios genéticos con el objetivo de estudiar un posible Síndrome de Rett como posible causa genética de las manifestaciones clínicas. Dado que estos estudios resultaron negativos, y ya en el contexto de esta Tesis Doctoral, se han realizado otra serie de estudios moleculares con el objetivo de hallar dicha causa.

Teniendo en cuenta el conjunto del cuadro clínico presentado por la paciente, surgió la sospecha clínica de que podría tratarse de un síndrome de poliendocrinopatía autoinmune, también conocido como síndrome APECED (OMIM# 240300). El síndrome APECED es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la presencia de candidiasis recurrentes y la aparición de endocrinopatías autoinmunes como la insuficiencia suprarrenal, manifestaciones clínicas que podrían coincidir con las presentadas por nuestra paciente. Otras manifestaciones asociadas a este síndrome son la diabetes tipo I y disfunciones intestinales. El APECED está causado por mutaciones producidas en la región 21q22.3, en la cual está codificado el gen *AIRE* (OMIM# 607358). Este gen actúa como regulador transcripcional de otros genes (Cervato et al., 2009), y en el desarrollo y maduración de los linfocitos T, siendo su papel más importante la selección negativa de linfocitos T autorreactivos (Lindh et al., 2008). Por todo esto, se comprobó la presencia de mutaciones en el gen *AIRE* en la paciente mediante un microarray CGH de resolución diagnóstica (60K). El resultado del estudio fue negativo para mutaciones en esta región.

A pesar de que no existían mutaciones en el gen *AIRE* que justificaran la sospecha clínica del APECED, se mantuvo la sospecha clínica de que el fenotipo de la paciente debía estar producido por un defecto congénito de base genética. De esta forma se justificaría la miopatía, la susceptibilidad a infecciones intestinales recurrentes, la desregulación endocrina manifestada con la deficiencia leve de IGF-1 y la insuficiencia adrenal observada por los datos clínico-analíticos, además de las alteraciones en la homeostasis glucídica. Por ello, y mediante el laboratorio Genetadi, se realizó un microarray genómico de 400.000 oligonucleótidos (400K) de alta resolución mediante hibridación genómica comparativa (aCGH). Mediante este análisis se identificó una duplicación bialélica de 4,1 Kb en el cromosoma 21, que incluye la banda 21q22.3. En esa duplicación se incluye el gen *LINC00315* (C21orf93) (Figura R.1A). Actualmente, no se conoce la función específica de este gen, aunque se sabe que codifica para un ARN regulador que no se expresa a nivel de proteína (Long Intergenic Nonprotein Coding RNA, Gene ID: 246704). Además, y hasta la fecha, tampoco se ha visto que *LINC00315* esté asociado a patologías. Lo que si se encuentra descrito hasta la fecha, es una co-

regulación transcripcional de este gen con otros genes del cromosoma 21 entre los que se encuentra el gen *AIRE* (Warnatz et al., 2010). Además, en esta región duplicada se han identificado elementos reguladores de la expresión en posición proximal y distal de los genes colágeno 18 alfa-1 (*COL18A1*), colágeno 6 alfa-1 (*COL6A1*), colágeno 6 alfa-2 (*COL6A2*), integrina beta-2 (*ITGB2*) y de *AIRE*.

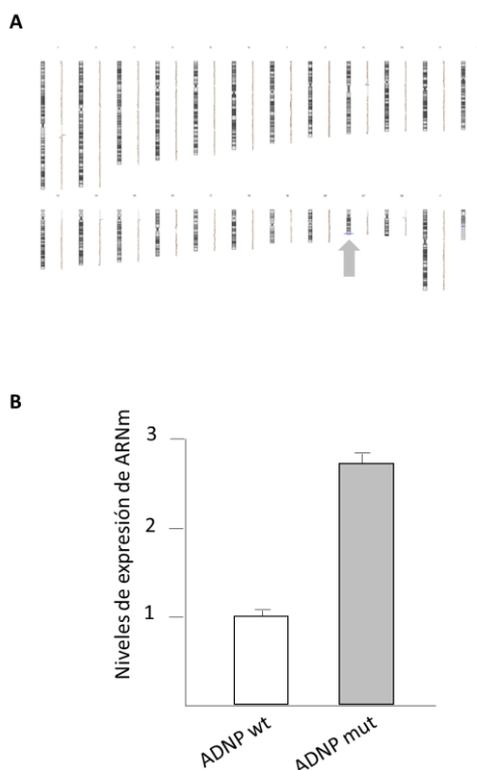


Figura R.1.- Duplicación del gen *linc00315*. **A)** Resultado del microarray CGH de 400K en el que se encontró una duplicación bialélica de 4,1 Kb en la región 21q22.3 (señalada con la flecha). **B)** Expresión de *linc00315* en linfocitos obtenidos de controles y en los linfocitos obtenidos de la paciente, donde se corrobora la sobreexpresión de dicho gen.

Para confirmar que la microduplicación en la región 21q22.3 era la causante de las diferentes manifestaciones clínicas, se llevaron a cabo estudios de expresión de los genes citados anteriormente y localizados en dicha región. Mediante la cuantificación de RNA de linfocitos de sangre periférica de la paciente, se comprobó la sobreexpresión de *LINC00315* respecto a controles (Figura R.1C). Sin embargo, su relación con la expresión del resto de genes que explicase un posible “síndrome de genes contiguos”, no se logró demostrar. A su vez, con el objetivo de encontrar alguna razón clínica para las infecciones recurrentes, también se ha realizado un estudio inmunológico de las diferentes poblaciones linfocitarias. Sin embargo, en este estudio no se encontró ningún desajuste de dichas poblaciones.

Por ello, y con la constante sospecha clínica de que la causa de la patología era un defecto congénito de base genética, se optó por realizar una secuenciación del exoma tanto de la paciente como de sus padres que permitiese estudiar posibles mutaciones, fundamentalmente *de novo*, que explicaran la patología de la paciente.

4.1.2.- Secuenciación del exoma trio

Las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), como la secuenciación del exoma (*Whole Exome Sequencing*, WES), o la secuenciación del genoma (*Whole Genome Sequencing*), han ofrecido en los últimos años nuevas oportunidades para dilucidar la base genética de las enfermedades conocidas como “raras”. Como se ha mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral, la técnica WES ya ha sido utilizada para la identificación de nuevos genes responsables del Síndrome del Espectro Autista, entre ellos, mutaciones *de novo* en el gen *ADNP*.

De esta forma, a partir de una muestra de sangre periférica de la paciente y otra muestra de sus padres, aislamos ADN genómico. Para realizar la secuenciación del exoma, utilizamos los servicios ofrecidos por la empresa Sistemas Genómicos de Valencia (España). El exoma fue secuenciado utilizando la tecnología Illumina, y los datos crudos se alinearon respecto al genoma de referencia (human, hg19, GRCh37). Tras realizar el filtrado de las variantes, obtuvimos 7 genes candidatos de ser la causa genética de las manifestaciones clínicas presentadas por la paciente: *PRSS56*, *C2*, *CFB*, *NOTCH4*, *ERBB2*, *CYP2B6* y *ADNP*. Esta selección se realizó, principalmente, basándonos en el efecto producido por la variante, la frecuencia alélica del cambio en la población general, el tipo de mutación y el posible daño producido en la proteína. En la tabla R.1 se pueden observar la posición en el genoma donde se localizan estos genes, el cambio de nucleótido que se produce en cada mutación, la frecuencia alélica del cambio en la población general, el efecto que produce la variante en la secuencia, el tipo de mutación de la que se trata, las patologías a las que pueden estar asociadas estas mutaciones y la predicción del daño que estas mutaciones pueden producir en la proteína codificada. Teniendo en cuenta estas características, realizamos una selección de nuestro gen candidato. De esta forma, observamos que la única mutación que produce un cambio en el marco de lectura es la ocurrida en el gen *ADNP*, de forma que además se produce una elongación debida a la inserción de un nucleótido. Por otro lado, la frecuencia alélica en la población general es desconocida para tres de las variantes encontradas: *ERBB2*, *CYP2B6* y *ADNP*. De los 7 genes candidatos, 6 de ellos, es decir, todos salvo *ADNP*, presentan mutaciones recesivas. Teniendo en cuenta la falta de antecedentes familiares, que las mutaciones *de novo* son las más abundantes en los trastornos del espectro autista, y que *ADNP* era el único gen asociado con autismo, decidimos iniciar el estudio de *ADNP*.

Hay que destacar que en el momento en el que obtuvimos el resultado de la

secuenciación del exoma, encontramos un trabajo recientemente publicado describiendo 10 casos de niños con mutaciones en el gen *ADNP* (Céline Helmsmoortel et al., 2014). Los 10 niños descritos presentaban una serie de características fenotípicas comunes entre ellos y con nuestra paciente. Además, dos de ellos presentaban la misma mutación en la proteína que nuestra paciente. A partir de ese momento, y por primera vez desde el inicio del seguimiento clínico de la niña, se la pudo asignar un diagnóstico clínico: Síndrome ADNP.

Tabla R.1.- Resultado del filtrado de variantes encontrado tras la secuenciación del exoma de la paciente y del exoma de sus padres. En la siguiente tabla se pueden encontrar los 7 genes candidatos obtenidos y las características mediante las cuales fueron seleccionados.

#HGNC	Chr	Pos	REF	VAR	Variant_effect	ALL_MAF	Tag	HGMD class	HGMD_disease	PolyPhen_prediction
PRSS56	chr2	233390199	C	G	missense_variant	0,0234	Recessive de_novo	DM	Microphthalmia	benign(0.05)
C2	chr6	31903804	G	C	missense_variant	0,0303	Recessive	DP	Complement C2 deficiency	probably_damaging(0.933)
CFB	chr6	31914024	T	A	missense_variant	0,0298	Recessive	DP	Macular degeneration risk association with	possibly_damaging(0.606)
NOTCH4	chr6	32188823	G	A	missense_variant	0,0289	Recessive	DP	Schizophrenia association with	benign(0.004)
ERBB2	chr17	37884037	C	G	missense_variant	-	Recessive	DP	Lung cancer increased Risk in females non-smokers and non-drinkers	possibly_damaging(0.813)
CYP2B6	chr19	41512841	G	T	missense_variant	-	Recessive	DFP	Altered S-methadone metabolism	benign(0.007)
ADNP	chr20	49509094	G	GT	frameshift_variant feature_elongation	-	De_novo	DM?	Autism	-

4.2.- Establecimiento y caracterización de un modelo celular primario para la realización de estudios genéticos y celulares

Una vez identificada la causa genética para las manifestaciones clínicas presentadas por la paciente, necesitábamos tener un modelo celular sobre el que poder estudiar los efectos fenotípicos de la mutación. El modelo celular ideal sería aquel que estuviera formado por células que presentaran de manera natural la misma mutación que nuestra paciente. La realización de una biopsia de piel supone un método mínimamente invasivo para la obtención de células. Además, existen estudios previos en los que se han empleado fibroblastos de piel como modelo celular en enfermedades neurodegenerativas (Auburger et al., 2012; Li et al., 2016). Además, esta opción también nos permitió crear un repositorio de células de la paciente mediante la amplificación del cultivo celular obtenido, eliminando la necesidad de nuevas biopsias de piel. En base a esto, decidimos utilizar fibroblastos y queratinocitos primarios de la paciente para los estudios celulares.

4.2.1.- Las células portadoras de la mutación en el gen *ADNP* presentan diferencias morfológicas y una menor capacidad proliferativa respecto a las células sin mutación

A partir de la biopsia de piel, mediante el procesamiento de la muestra, obtuvimos un cultivo celular de queratinocitos de piel y un cultivo celular de fibroblastos (Figura R.2A). Lo primero que observamos en estos cultivos, fueron diferencias en la morfología celular entre las células obtenidas de la paciente y las células procedentes de controles sanos. Como se puede observar en la figura R.2B arriba a la izquierda, los queratinocitos presentan una morfología poligonal cuando se encuentran en cultivo celular, con unas uniones intercelulares bien definidas. Sin embargo, en los queratinocitos que presentan la mutación en el gen *ADNP* (Figura R.2B arriba a la derecha), observamos zonas donde vemos esta morfología típica de estas células, mientras que en otras zonas del cultivo encontramos células redondeadas. En estas regiones, las células son más refringentes y presentan mayores espacios intercelulares, dando la sensación de sufrir una pérdida de adhesión celular junto con una morfología mitótica. Además de estas observaciones, también apreciamos que las células portadoras de la mutación, presentan un aspecto más diferenciado que incluye un mayor tamaño celular.

Respecto a los fibroblastos, también observamos diferencias en la morfología entre los controles y los aislados a partir de la biopsia de la paciente (Figura R.2B, abajo). Como se puede apreciar en los controles, los fibroblastos son células adherentes con una morfología fusiforme y plana acompañada de prolongaciones cortas. Cuando estas células se encuentran en cultivo celular, se encuentran formando haces de fibras. En los fibroblastos portadores de la mutación (figura R.2B abajo a la derecha), vemos que no crecen formando haces, sino que se encuentran aislados y presentan una morfología estrellada.

Mediante la realización de una PCR alelo-específica, comprobamos que nuestro modelo celular presentaba la mutación en el gen *ADNP* encontrada en la paciente (Figura R.2C). Mediante esta técnica, pudimos discriminar la expresión entre el alelo mutado y el no mutado y confirmamos que los queratinocitos y los fibroblastos aislados de la piel de nuestra paciente expresan tanto el alelo wild type (no mutado) como el alelo mutado. Por el contrario, las células empleadas como control, expresan únicamente el alelo no mutado.

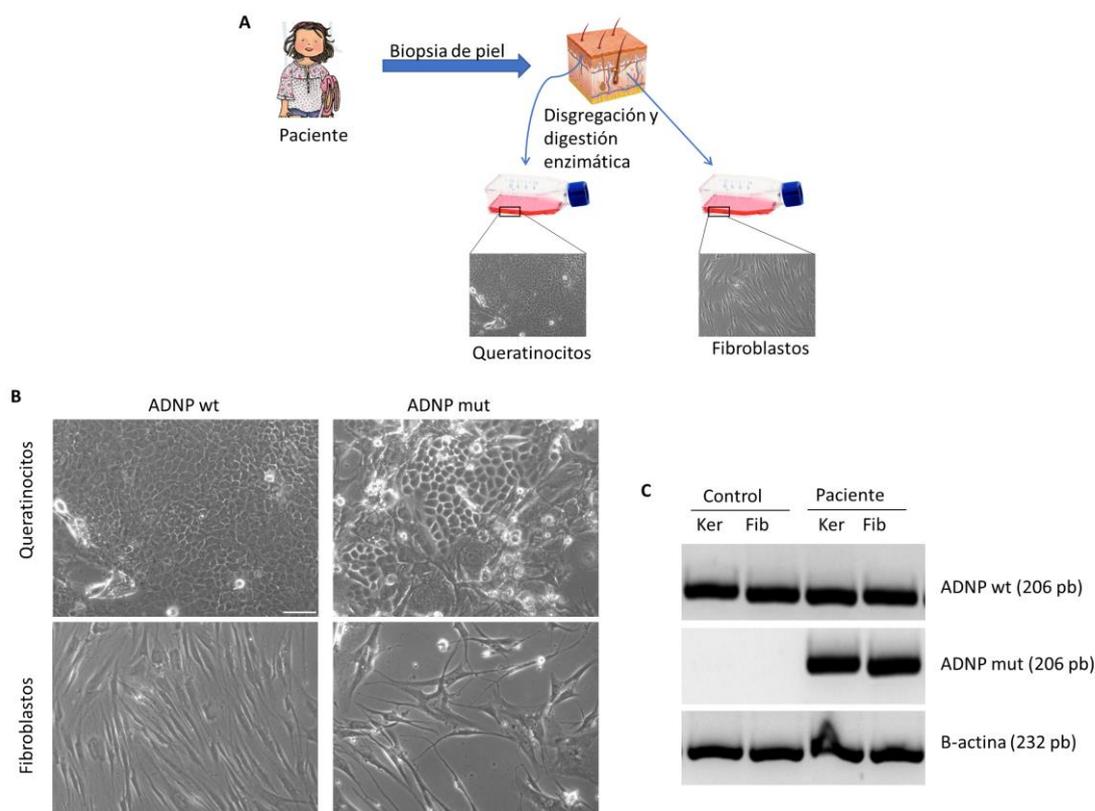


Figura R.2.- Establecimiento de los modelos celulares *in vitro*. **A)** En este esquema podemos observar como a partir de una biopsia de piel de la paciente y de los controles sanos, mediante disgregación y digestión enzimática del tejido, obtuvimos un cultivo celular de queratinocitos y de fibroblastos que nos servirá como modelo celular sobre el que poder estudiar los efectos de la mutación. **B)** Imágenes en contraste de fase de los cultivos obtenidos donde se observan las diferencias en la morfología celular. ADNP wt: wild type, ADNP mut: mutado. Barra de escala: 50 μ m. **C)** Resultado de la PCR alelo-específica que confirma la validez de los modelos celulares respecto a la presencia de la mutación en *ADNP*. Ker: queratinocitos; Fib: Fibroblastos.

Una vez establecidos los cultivos celulares, observamos en ambos tipos celulares, que las células portadoras de la mutación tardaban más tiempo en alcanzar la confluencia si se comparaban con los controles. Concretamente, observamos que las células mutantes tardaban aproximadamente el doble de tiempo en llegar a confluencia si los comparábamos con los controles. Por esta razón, realizamos una curva de proliferación con el objetivo de estudiar la capacidad de crecimiento de ambos tipos celulares a diferentes tiempos (Figuras R.3A y R.3B). En el caso de los queratinocitos (Figura R.3A), observamos que la capacidad proliferativa de las células portadoras de la mutación es muy inferior a la capacidad proliferativa de los controles. Aunque el número de queratinocitos mutantes presentes en el cultivo incrementa a lo largo del tiempo, no llega a alcanzar el número de células que alcanzan los queratinocitos empleados como control. Respecto al crecimiento de los fibroblastos portadores de la mutación (Figura

Resultados

R.3B), observamos un resultado similar al de los queratinocitos. A lo largo del tiempo, el número de fibroblastos mutantes también incrementa, pero una vez más observamos que este incremento de la proliferación no se produce en la misma proporción que el incremento de la proliferación de los fibroblastos empleados como control.

Además de cuantificar la proliferación de estas células, y dado que los queratinocitos de piel crecen formando colonias, también analizamos la capacidad clonogénica de estas células. Para ello, realizamos un ensayo de clonogenicidad (Figura R.3C). Mediante este ensayo, podemos observar las colonias de queratinocitos teñidas en color rosa. Lo que encontramos fue un llamativo menor número de colonias de los queratinocitos portadores de la mutación en el gen *ADNP* respecto al control. Es decir, los queratinocitos mutantes no eran capaces de formar colonias. Este hecho encaja con la menor capacidad proliferativa que poseen estas células. Y aunque tras realizar la tinción para observar las colonias, el resultado parecía estar bastante claro, decidimos cuantificar este resultado (Figura R.3D). Para ello, y gracias a la ayuda del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Cantabria, cuantificamos la densidad celular en cada pocillo midiendo la absorbancia. Tras realizar las mediciones y los diferentes cálculos, corroboramos que efectivamente, la capacidad clonogénica de los queratinocitos mutantes era menor respecto al control. Además, esta diferencia es significativamente estadística ($p < 0,01$).

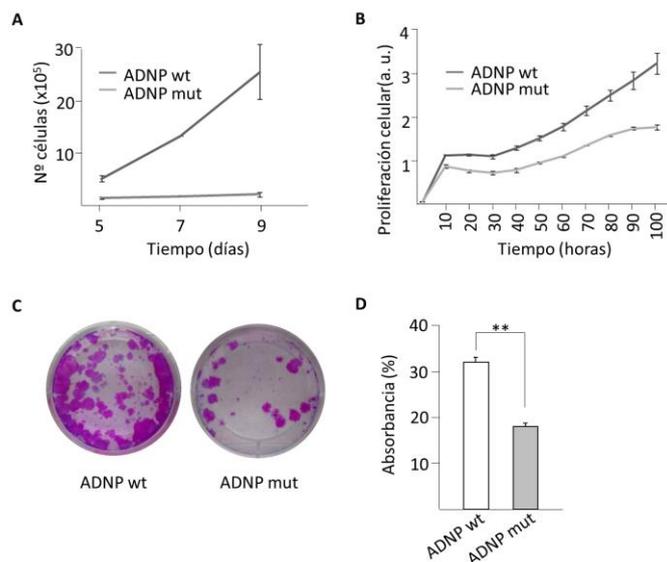


Figura R.3.- Estudio de la capacidad proliferativa de los modelos celulares procedentes de piel. **A)** Curva de proliferación de queratinocitos realizada mediante la cuantificación con la cámara de Neubauer. **B)** Curva de proliferación de fibroblastos cuantificada con XCELLigence. **C)** Ensayo de clonogenicidad que muestra que los queratinocitos que poseen la mutación también presentan una menor capacidad. **D)** Cuantificación del ensayo de clonogenicidad mediante la absorbancia a 400-700 nm de las células teñidas con rodamina B. El histograma representa los valores promedio \pm SD de tres experimentos independientes. Significación estadística ** $p < 0,01$.

4.2.2.- Los queratinocitos de piel portadores de la mutación en el gen *ADNP* presentan una mayor diferenciación terminal escamosa

Siguiendo con la caracterización de nuestro modelo celular, estudiamos la capacidad de diferenciación terminal escamosa de los queratinocitos de piel.

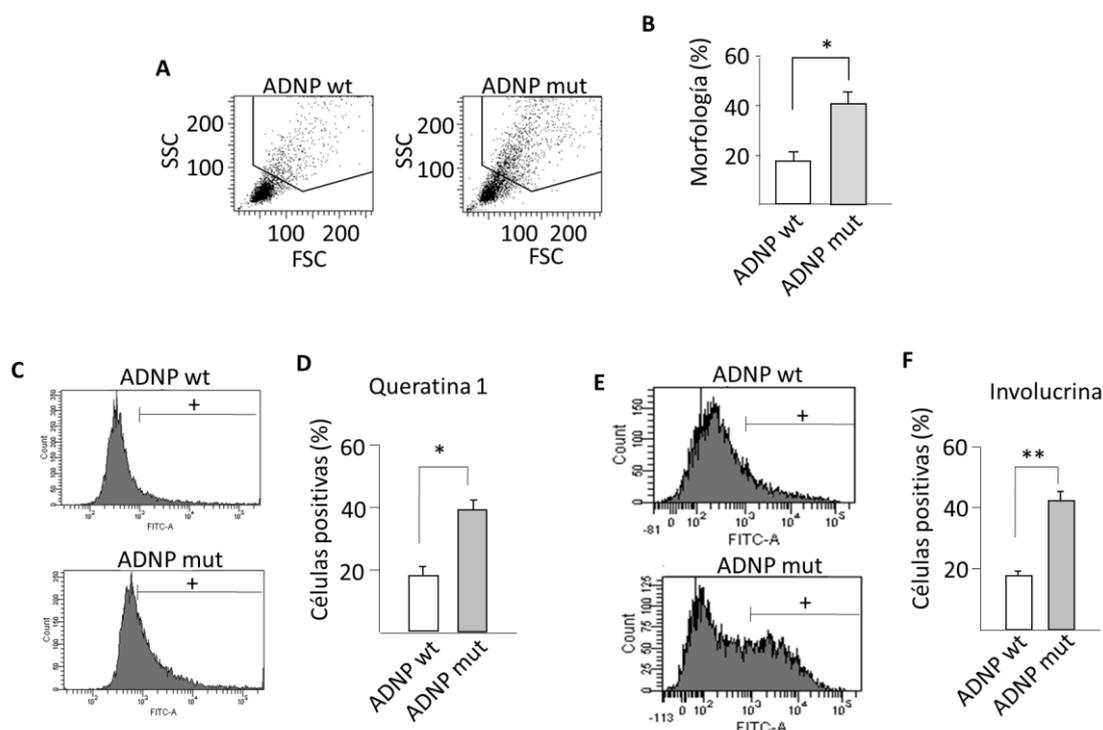


Figura R.4.-Estudio de la diferenciación celular en queratinocitos de piel. A) Análisis del tamaño y la complejidad celular de los queratinocitos mediante citometría de flujo. **B)** Cuantificación del tamaño celular. Los datos corresponden a las regiones señaladas en los histogramas de A. **C)** Análisis de la expresión de la queratina 1 mediante citometría de flujo. **D)** Cuantificación de la expresión de queratina 1 según los datos obtenidos mediante la citometría de flujo. **E)** Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de involucrina. **F)** Cuantificación de la expresión de involucrina a partir de los datos obtenidos mediante citometría de flujo. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: células que presentan el alelo mutado. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Mediante el análisis con citometría de flujo, realizamos un estudio de la expresión de los principales marcadores de diferenciación terminal en queratinocitos: queratina 1 (KRT1) e involucrina (IVL). Lo primero que nos encontramos al realizar estos análisis, fue que los queratinocitos portadores de la mutación presentaban un mayor tamaño y una mayor complejidad celular respecto a los queratinocitos que no poseen la mutación (Figuras R.4A y R.4B). Concretamente, se producía un incremento de tamaño y complejidad de las células mutantes del 20 % ($p < 0,05$) respecto al control. Al analizar la expresión de los dos marcadores de diferenciación (Figuras R.4C y R.4E), observamos

que la expresión de ambos era mayor en los queratinocitos mutantes respecto al control. Al cuantificar el porcentaje de células positivas para cada marcador, podemos observar claras diferencias de expresión. En el caso de la queratina 1 (Figura R.4D), vemos un incremento de expresión del 20 % entre las células positivas mutantes y las células positivas del control, siendo este incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Respecto a la expresión de involucrina (Figura R.4F), también observamos un incremento de más del 20 % ($p < 0,01$) en la expresión de este marcador en las células mutantes respecto al control.

4.3.- Estudio inmunofenotípico de la piel de la paciente a partir de biopsia de piel

La realización de la biopsia de piel de la paciente, además de permitirnos establecer un modelo de cultivo celular, también nos ha permitido realizar un estudio *in situ* de la piel. De esta forma, hemos podido estudiar características de la piel de la paciente como son el grosor de la epidermis, o la expresión de proteínas del ciclo celular.

4.3.1.- En secciones de piel procedentes de la paciente, encontramos una menor proliferación celular junto con una mayor diferenciación

Mediante una simple ecografía de piel se puede medir el grosor de la epidermis, como se indica entre las flechas de la figura R.5A. De esta forma pudimos medir el grosor de la piel del antebrazo en su cara ventral en nuestra paciente, siendo esta medida de 0,9 milímetros. Al realizar la misma medida en la misma zona anatómica en otros 8 controles del mismo sexo, peso y edad, encontramos que el grosor de la epidermis era de $1,2 \pm 0,1$ milímetros. El grosor de la piel de los controles se encuentra dentro del rango de valores normales tal y como se describe en la literatura (Van Mulder et al., 2017).

Al teñir los cortes de piel obtenidos mediante la biopsia con hematoxilina/eosina, también observamos que la epidermis de la paciente presentaba un grosor menor si lo comparamos con cortes de piel de controles de una edad aproximada y obtenidos de la misma región corporal (Figura R.5B). Sin embargo, observamos que el grosor de capa córnea de la epidermis era mayor en la paciente respecto a los controles, tal como se indica en las imágenes inferiores de la figura R.5B con las flechas negras. Para conocer cuál era la diferencia en el grosor de esta capa entre nuestra paciente y el control, llevamos a cabo su cuantificación en secciones de piel inmunomarcadas para queratina 10 (KRT10), donde se indica el grosor de la capa córnea con las flechas blancas en la figura R.5C. Tras realizar la cuantificación (Figura R.5D), vimos que el grosor de esta capa era aproximadamente 3 veces mayor ($p < 0,001$)

respecto al control. Este resultado es consistente con la aparición de hiperqueratosis en la paciente (Figura R.5E).

Estas imágenes de la figura 5 nos aportan más información. Cuando observamos las imágenes inferiores de la figura R.5B, vemos que los queratinocitos que forman la epidermis del control se encuentran distribuidos de una forma más compacta. Si lo comparamos con la imagen correspondiente a la paciente (*ADNP* mut), no vemos esta distribución compacta. Además, en la epidermis de la paciente observamos una pérdida de celularidad junto con la presencia de mitosis aberrantes o atípicas. En la figura R.5B, en la parte inferior, las flechas amarillas indican estas diferencias celulares entre el control y la paciente.

Por otro lado, el marcaje de las secciones de piel con queratina 10 (Figura R.5C), nos aporta información sobre la mayor diferenciación de los queratinocitos de la piel de nuestra paciente. Con este marcaje observamos que la expresión de este marcador de diferenciación es más intensa en la paciente respecto al control, por lo que una vez más, tenemos evidencias de la mayor diferenciación de los queratinocitos portadores de la mutación en el gen *ADNP*. Mediante este marcaje también observamos que el tamaño de los núcleos de las células mutadas parecía mayor. Anteriormente habíamos comprobado que las células mutantes poseían un mayor tamaño celular, y esto suele ir acompañado de un incremento en el tamaño nuclear debido a la generación de células poliploides. Por esta razón, realizamos una cuantificación del tamaño de los núcleos de estas células (Figura R.5F). Para ello, sirviéndonos de que los núcleos habían sido teñidos con DAPI, realizamos una cuantificación de su área. De esta forma corroboramos que de forma significativa ($p < 0,05$), los núcleos de las células mutantes son mayores que los núcleos de las células no mutantes. Este dato también nos aporta indicios de la mayor diferenciación que sufren estas células de la paciente.

Resultados

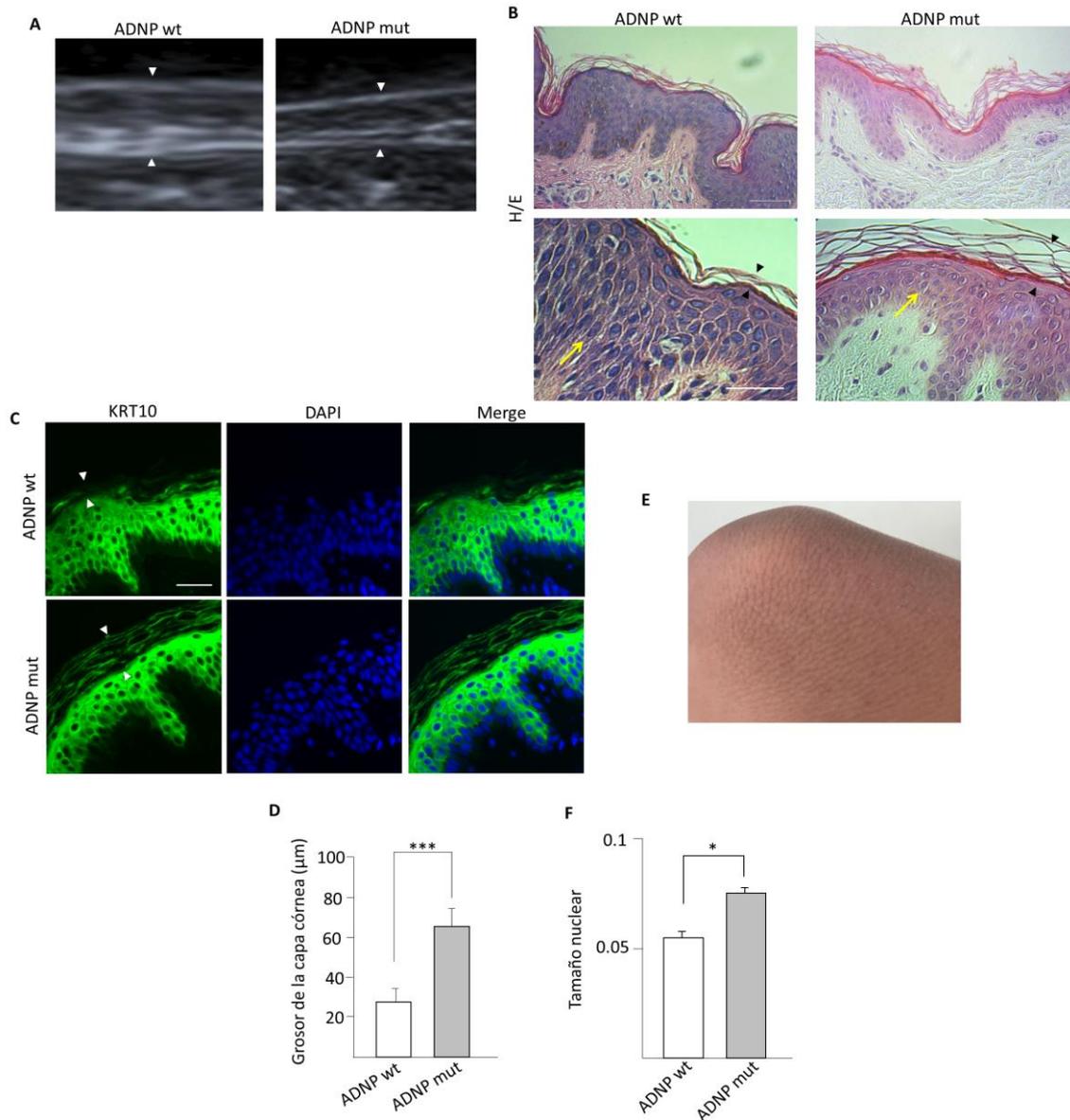


Figura R.5.- Estudio de las características fenotípicas de piel de la paciente. A) Imagen obtenida mediante ecografía donde se puede observar que el menor grosor de la epidermis puede ser detectado mediante esta técnica. **B)** Tinción con hematoxilina/eosina en la que se puede observar tanto el menor grosor de la epidermis, como el mayor grosor del estrato córneo en la piel de la paciente (ADNP mut). Con un mayor aumento, se puede observar la menor celularidad de la epidermis, junto con la morfología más redondeada y la presencia de mitosis aberrantes (indicado con la flecha). **C)** Marcaje de queratina 10 mediante inmunofluorescencia realizada en secciones de piel desparafinadas. **D)** Cuantificación del grosor de la capa córnea en las muestras marcadas con queratina 10. **E)** Imagen obtenida de la paciente donde podemos ver la hiperqueratosis desarrollada. **F)** Cuantificación del tamaño nuclear de los queratinocitos de las capas suprabasales de la epidermis. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: mutación. El histograma representa los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Barra de escala: 50 μm . Núcleos teñidos con DAPI.

4.3.2.- La piel procedente de la paciente portadora de la mutación en el gen *ADNP* presenta diferencias en la expresión de las proteínas del ciclo celular de queratinocitos

A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento, en los que observamos una menor proliferación y una mayor diferenciación junto con las diferencias morfológicas que presentaban los queratinocitos portadores de la mutación en *ADNP*. Teniendo en cuenta que ante una pérdida de adhesión los queratinocitos se diferencian y los fibroblastos inician el proceso de apoptosis, nos planteamos la hipótesis de si podría estar produciéndose un defecto en la adhesión celular.

Para poder estudiar la adhesión celular de los fibroblastos, empleamos un método indirecto. Realizamos un estudio de la expresión de AnexinaV, el cual es un marcador de apoptosis, mediante citometría de flujo. Nos decantamos por este método ya que cuando los fibroblastos pierden su capacidad de adhesión al sustrato, mueren mediante el proceso de muerte celular programada o apoptosis, en este caso denominada anoikis. Por otro lado, el defecto en el crecimiento de los cultivos celulares también podría deberse a una mayor tasa de apoptosis. Por tanto, al realizar este experimento, en base a nuestra hipótesis de una menor adhesión celular, esperaríamos que la expresión de AnexinaV fuera mayor en los fibroblastos mutantes que en el control. Tras realizar el experimento y cuantificar las células positivas (Figura R.6), vimos que entre los fibroblastos mutantes había un menor porcentaje de células positivas para este marcador de apoptosis. Basándonos en este resultado, los fibroblastos mutantes tampoco tendrían un problema de adhesión celular.

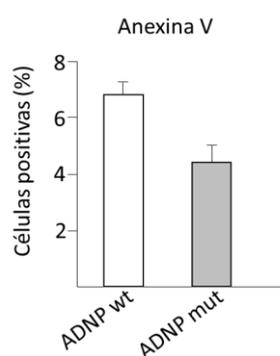


Figura R.6.- Estudio indirecto de la adhesión celular en fibroblastos. Estudio de la apoptosis en fibroblastos. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: mutación. El histograma representa los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

Una vez que vimos que no parecía haber un defecto de adhesión en las células mutantes, el siguiente paso fue comprobar si los defectos en proliferación y diferenciación podían deberse a daño en el ADN de estas células. Para ello, estudiamos la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX). Esta histona juega un papel importante en el reclutamiento y acumulación de las proteínas necesarias para la reparación de roturas de doble hebra en el ADN (Dickey et al., 2009). Por tanto, la fosforilación de esta proteína es un marcador temprano de daño en el ADN. Tras estudiar su expresión en secciones de piel tanto de un control como de la paciente (Figura R.7A), observamos que no parecía haber diferencias entre las células mutantes y las no mutantes, salvo quizá una expresión más intensa en el control. Al cuantificar el porcentaje de células positivas para la expresión de γ H2AX respecto a células basales (Figura R.7B), corroboramos que no había diferencias, siendo el porcentaje de células positivas prácticamente el mismo en ambas muestras.

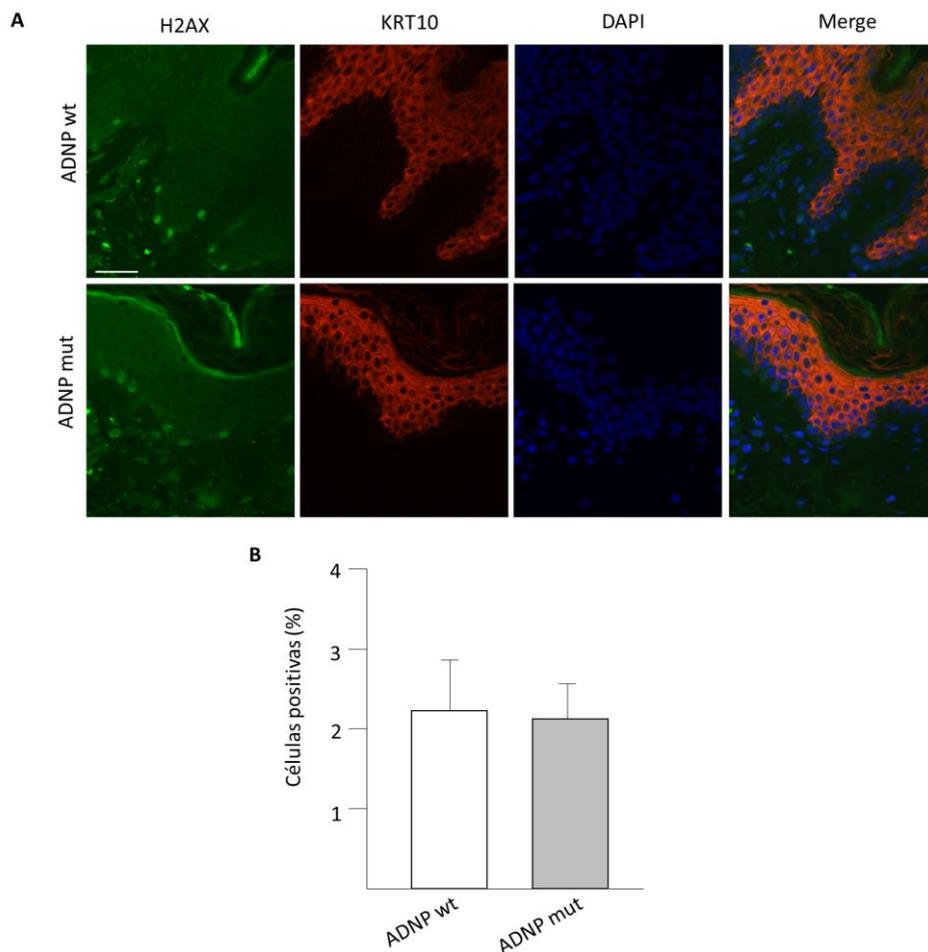


Figura R.7.- Estudio de daño en el ADN mediante la expresión de H2AX. A) Expresión de H2AX y de queratina 10. **B)** Cuantificación de las células positivas para H2AX. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: secciones de piel procedentes de la paciente con la mutación en *ADNP*. El histograma representa los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Barra de escala: 50 μ m. Núcleos teñidos con DAPI.

El siguiente paso fue realizar un estudio de la expresión de las proteínas del ciclo celular, ya que un defecto en el ciclo, también podría conllevar a una mayor diferenciación de los queratinocitos. Por este motivo estudiamos la expresión de tres ciclinas: A, B y E. Para ello realizamos un inmunomarcaje de secciones de piel tanto de un control como de la paciente, con anticuerpos que reconocen estas proteínas.

Al estudiar la expresión de la ciclina A (Figura R.8A), también realizamos la inmunodetección de queratina 10 para conocer el patrón de expresión de esta ciclina en las diferentes capas de la epidermis. En las secciones de piel de la paciente, vimos que la expresión de la ciclina A se producía fundamentalmente en la capa peribasal, lo cual es típico de la diferenciación escamosa (Zanet et al., 2010), mientras que en el control la expresión de esta proteína se localizaba con frecuencia en la capa basal. Además, la expresión de la ciclina A en la epidermis de la paciente era mucho más marcada. Dada esta diferencia de expresión, realizamos una cuantificación para saber el porcentaje de células positivas en cada muestra respecto al número total de células (Figura R.8B). Lo que nos encontramos fue que, en la piel de la paciente, la expresión de esta ciclina esta incrementada de forma significativa ($p < 0,01$). Concretamente, la proporción de células positivas para ciclina A en la piel mutante es 4 veces mayor que en la piel control.

Cuando estudiamos la expresión de la ciclina B (Figura R.8C), no encontramos expresión de esta proteína en la piel de la paciente, es decir, no había ninguna célula positiva para la expresión de ciclina B. Sin embargo, en el control si encontramos células positivas para dicha ciclina. Junto con la ciclina B, estudiamos la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 (Figura R.8C). En este caso, aunque detectamos la expresión de Ki67 en la piel de la paciente, tanto su intensidad como la cantidad de células positivas eran menores respecto al control. En el control, observamos que una mayoría de las células de la capa basal eran positivas para la expresión de este marcador, mientras que en la piel de la paciente había raramente células positivas.

Respecto a la expresión de ciclina E (Figura R.8D). Al igual que en el estudio de la ciclina A, junto con la ciclina E realizamos el inmunomarcaje de queratina 10. De esta forma, además de volver a observar una mayor expresión de esta queratina, con la que corroboramos la mayor diferenciación de las células de la paciente, podíamos conocer la distribución de la ciclina E a través de las diferentes capas de la epidermis. En el control observamos que esta proteína se acumulaba, como está descrito (Zanet et al., 2010), en las capas suprabasales de la epidermis, mientras que, en la paciente, no vimos este patrón de expresión. En la epidermis de la paciente esta proteína se detectó solamente en la capa basal.

Resultados

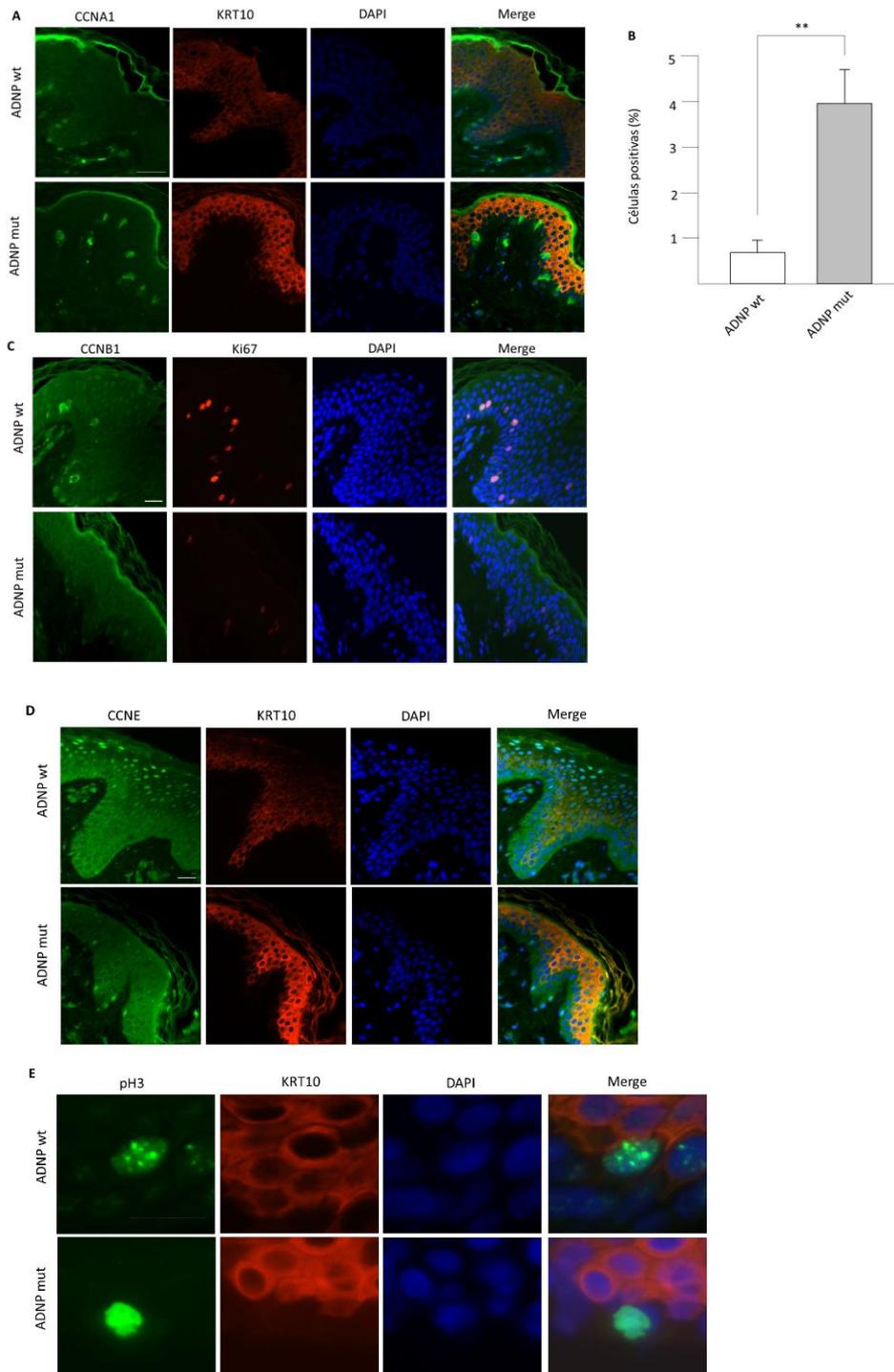


Figura R.8.- Expresión en secciones de piel embebidas en parafina de proteínas involucradas en el ciclo celular de los queratinocitos. A) Expresión de ciclina A y de queratina 10. **B)** Cuantificación de las células positivas para la ciclina A. **C)** Expresión de ciclina B y el marcador de proliferación celular Ki-67. **D)** Expresión de ciclina E y queratina 10. **E)** Expresión de la fosfohistona H3 para estudiar el estado de condensación de la cromatina, junto con la expresión de la queratina 10. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: secciones de piel procedentes de la paciente con la mutación en *ADNP*. El histograma representa los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística ** $p < 0,01$. Barra de escala: 50 μ m. Núcleos teñidos con DAPI.

Además de estas proteínas, también realizamos un estudio de la condensación de la cromatina durante la metafase. Para ello, realizamos un marcaje con la fosfo-histona H3 (pH3) sobre las secciones de piel (Figura R.8E). Según el patrón de expresión de esta proteína, podemos saber, cuando las células se encuentran en mitosis, si la cromatina está condensada en cromosomas. En el control observamos un patrón punteado en aquellas células que se encuentran en mitosis. Es decir, el patrón que corresponde a la condensación de la cromatina como cromosomas. Sin embargo, en la paciente no vimos ese patrón punteado, sino que encontramos un patrón fuerte y difuso que nos indicaba que la cromatina no se hallaba condensada como corresponde a los cromosomas metafásicos.

4.4.- Desarrollo de una posible estrategia terapéutica para corregir las alteraciones producidas por la mutación en *ADNP*

Como he mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral, la proteína ADNP posee un fragmento activo denominado NAP. Y dado que diversos estudios, como también se ha comentado, han demostrado un efecto protector de este péptido frente a diferentes agresiones celulares, quisimos estudiar cuál sería el efecto producido sobre nuestro modelo celular al añadir NAP al medio de cultivo.

4.4.1.- El péptido NAP incrementa de forma tendencial la capacidad proliferativa de queratinocitos y fibroblastos *in vitro*

El primer paso fue establecer una concentración a la cual poder observar los posibles efectos del tratamiento. Mediante los estudios existentes, sabíamos que, en modelos neuronales, NAP ejerce su efecto protector a concentraciones del orden femtomolar. Basándonos en esos datos, partimos de diferentes concentraciones para tratar los queratinocitos y los fibroblastos. Probamos varias concentraciones del orden nanomolar hasta 1 μ M. Para decantarnos por una concentración única, nos basamos en ensayos de clonogenicidad. Para ello sembramos los queratinocitos como en un ensayo de clonogenicidad normal, pero añadiendo a la mitad de los pocillos el péptido NAP desde el inicio del experimento (Figura R.9). Pese a que no se aprecian diferencias con las células mutantes (se sembraron un mayor número de células mutantes debido a la menor proliferación de estas), nos decantamos por la concentración de 100 nM basándonos en que a esa concentración no se veía afectada la capacidad proliferativa del control (no era tóxico) y en que las colonias de los queratinocitos portadores de la mutación parecían más grandes respecto a los queratinocitos portadores de la mutación sin el tratamiento con NAP.

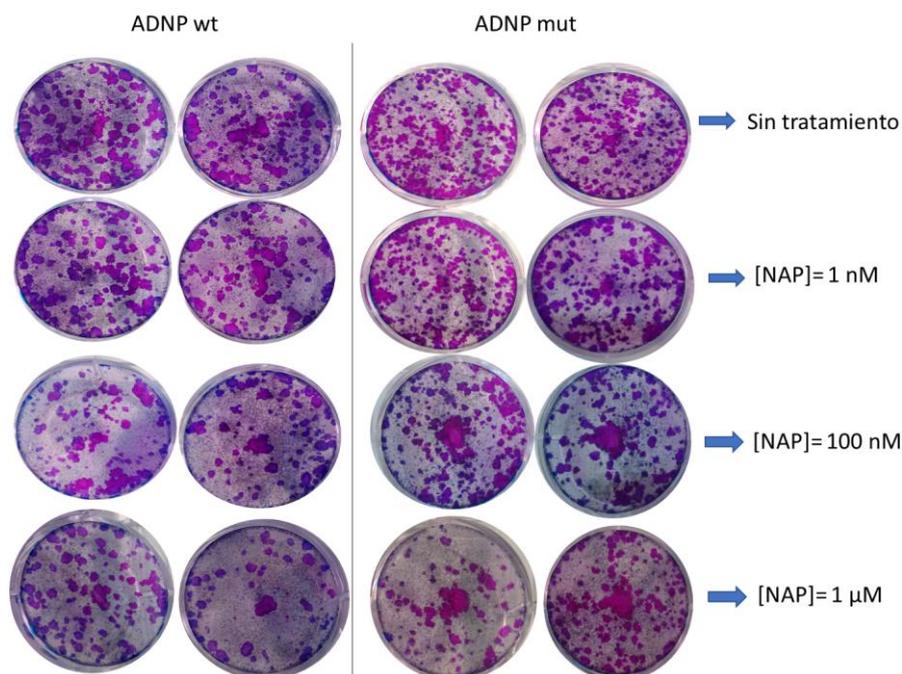


Figura R.9.- Ensayos de clonogenicidad con diferentes concentraciones del péptido NAP. Tras probar diferentes concentraciones y basándonos en el tamaño y número de las colonias de queratinocitos, optamos por la concentración de 100 nM. Células control (ADNP wt) sembradas: 2.500 células por pocillo. Células mutantes (ADNP mut) sembradas: 7.500 células por pocillo.

Una vez establecida la concentración del péptido NAP en 100 nM como adecuada para el tratamiento de queratinocitos *in vitro*, realizamos diversos estudios para comprobar cuál era su efecto. En todos los experimentos realizados con el péptido, lo añadimos al cultivo celular desde el inicio del experimento, a tiempo 0. Lo primero que estudiamos fue la capacidad de proliferación celular. Para ello, volvimos a realizar curvas de proliferación tanto para los queratinocitos como para los fibroblastos, cuantificando la proliferación a diferentes tiempos (Figuras R10.A, R10.B, R.10C y R.10D). En el caso de los queratinocitos, tras añadir el péptido NAP, no observamos ningún efecto en las células control entre las tratadas y las no tratadas (Figura R.10A). Es decir, NAP no afecta a la proliferación celular de las células no mutantes. Sin embargo, tras tratar las células portadoras de la mutación en *ADNP* con este péptido, observamos un incremento de la proliferación respecto a las células mutantes no tratadas. Pese al tratamiento con NAP, no se llega a corregir por completo el defecto en la proliferación. Sin embargo, el incremento de la proliferación de las células mutantes sometidas al tratamiento respecto a las no tratadas es reproducible.

Respecto a la proliferación de los fibroblastos, tras el tratamiento con el péptido NAP a una concentración de 100 nM, no observamos ningún efecto en la proliferación, ni siquiera en los fibroblastos mutados (datos no mostrados). Por ello,

optamos por utilizar una concentración mayor, concretamente 600 nM. Una vez realizada la curva de proliferación, en el control tampoco observamos ningún efecto, ni beneficioso ni perjudicial respecto al tratamiento (Figura R.10C). Pero en los fibroblastos portadores de la mutación, sí vimos un efecto del péptido, volviendo a incrementarse la proliferación respecto a las células mutantes no tratadas (Figura R.10D).

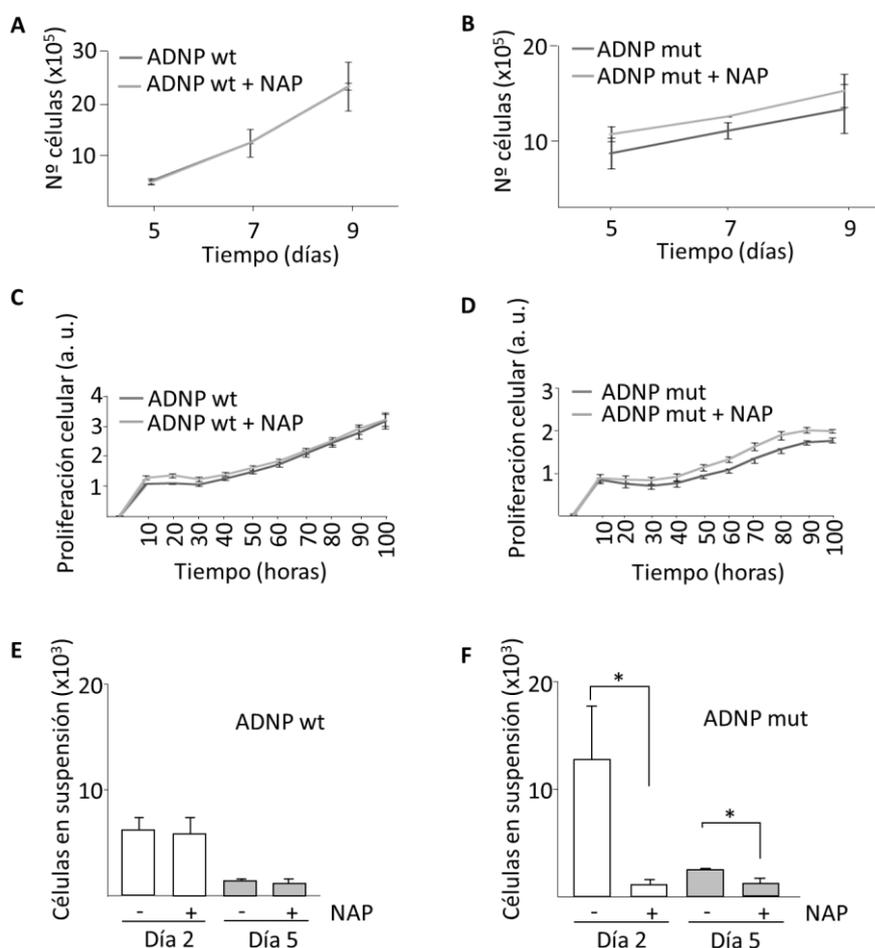


Figura R.10.- Estudio del efecto del péptido NAP sobre la proliferación celular. A) Curva de proliferación de queratinocitos sin la mutación en *ADNP* con y sin el tratamiento con NAP. **B)** Curva de proliferación de queratinocitos portadores de la mutación en *ADNP* con y sin el tratamiento con NAP. **C)** Curva de proliferación de fibroblastos sin la mutación en *ADNP* con y sin el tratamiento con NAP. **D)** Curva de proliferación de fibroblastos portadores de la mutación en *ADNP* con y sin el tratamiento con NAP. **E)** Cuantificación en diferentes tiempos de los queratinocitos sanos desprendidos del cultivo celular, con y sin el tratamiento con NAP. **F)** Cuantificación de los queratinocitos mutantes desprendidos del cultivo celular, en diferentes tiempos y con y sin el tratamiento con NAP. ADNP wt: wild type, controles; ADNP mut: células portadoras de la mutación. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística * $p < 0,05$.

A la vez que realizamos la curva de proliferación de los queratinocitos, y aprovechando el tratamiento con el péptido, decidimos cuantificar las células que se desprenden del cultivo (Figuras R.10E y R.10F). Estas células del sobrenadante corresponden a las células diferenciadas. Por tanto, tras recoger los queratinocitos del sobrenadante a los 2 y 5 días del inicio del experimento, realizamos su cuantificación. En el control (Figura R.10E), una vez más, no observamos ningún efecto del péptido sobre estas células respecto a las que no han recibido el tratamiento. En los queratinocitos portadores de la mutación (Figura R.10F), observamos que el péptido NAP, a una concentración de 100 nM, consigue revertir el número de células que se desprenden, llegando a ser 10 veces menor el número de células en el sobrenadante ($p < 0,05$) tras dos días de tratamiento. Tras 5 días de tratamiento, la disminución de células en el sobrenadante es menor, pero también significativa ($p < 0,05$).

4.4.2.- El péptido NAP disminuye la diferenciación terminal en queratinocitos

Al encontrar que el péptido NAP es capaz de revertir en parte el defecto en la proliferación celular de aquellas células que poseen una mutación en el gen *ADNP*, nuestro siguiente paso fue estudiar el efecto de dicho péptido sobre la diferenciación terminal que sufren estas células.

Por esta razón, realizamos un estudio de la expresión de los marcadores de diferenciación terminal, pero esta vez, añadiendo el péptido NAP tanto a los queratinocitos sin la mutación como a los que poseen la mutación en *ADNP*. Así pues, estudiamos la expresión de la involucrina y de la queratina 1. Para el estudio de la expresión de involucrina, realizamos la cuantificación mediante citometría de flujo (Figuras R.11A y R.11B). Una vez más, vimos que la expresión de involucrina era mayor en los queratinocitos portadores de la mutación respecto al control, en este caso, la expresión era un 15 % mayor (Figura R.11A arriba a la derecha). Pero tras tratar estas células con el péptido NAP, observamos que su expresión disminuía, aunque sin llegar a los niveles del control (Figura R.11A, abajo a la derecha). Tras realizar el análisis y cuantificar el número de células positivas para la expresión de involucrina (Figura R.11B), pudimos ver que el tratamiento con el péptido no tiene ningún efecto sobre las células control. Sin embargo, en los queratinocitos portadores de la mutación, tras el tratamiento, observamos una disminución de casi el 10 % ($p < 0,05$) de la expresión de este marcador de diferenciación respecto a los queratinocitos mutantes no tratados.

Otro dato que pudimos analizar mediante citometría de flujo, fue si se producía algún cambio en la morfología celular. Este dato lo estudiamos mediante la complejidad y el tamaño celulares (Figura R.11C). De esta forma, tras realizar la cuantificación de los datos obtenidos (Figura R.11D), encontramos un resultado similar al de la expresión de involucrina. Corroboramos que los queratinocitos mutantes poseen un mayor tamaño y complejidad celulares que los no mutados, siendo la diferencia de casi un 20 %. No vimos

un efecto de NAP sobre los queratinocitos control respecto a su morfología celular. Pero en los queratinocitos mutantes tratados, encontramos una disminución significativa ($p < 0,05$) del tamaño y la complejidad celulares respecto a los mutantes no tratados.

Para estudiar la expresión de la queratina 1, analizamos sus niveles de expresión del ARN mensajero (Figura R.11E). Una vez más, encontramos un incremento en la expresión de este marcador en las células mutadas. Pero tras el tratamiento con NAP, vimos una disminución de la expresión de este marcador de diferenciación terminal en los queratinocitos mutantes respecto a los no tratados que era estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En el control, al igual que en los experimentos anteriores, no observamos ningún efecto tras el tratamiento.

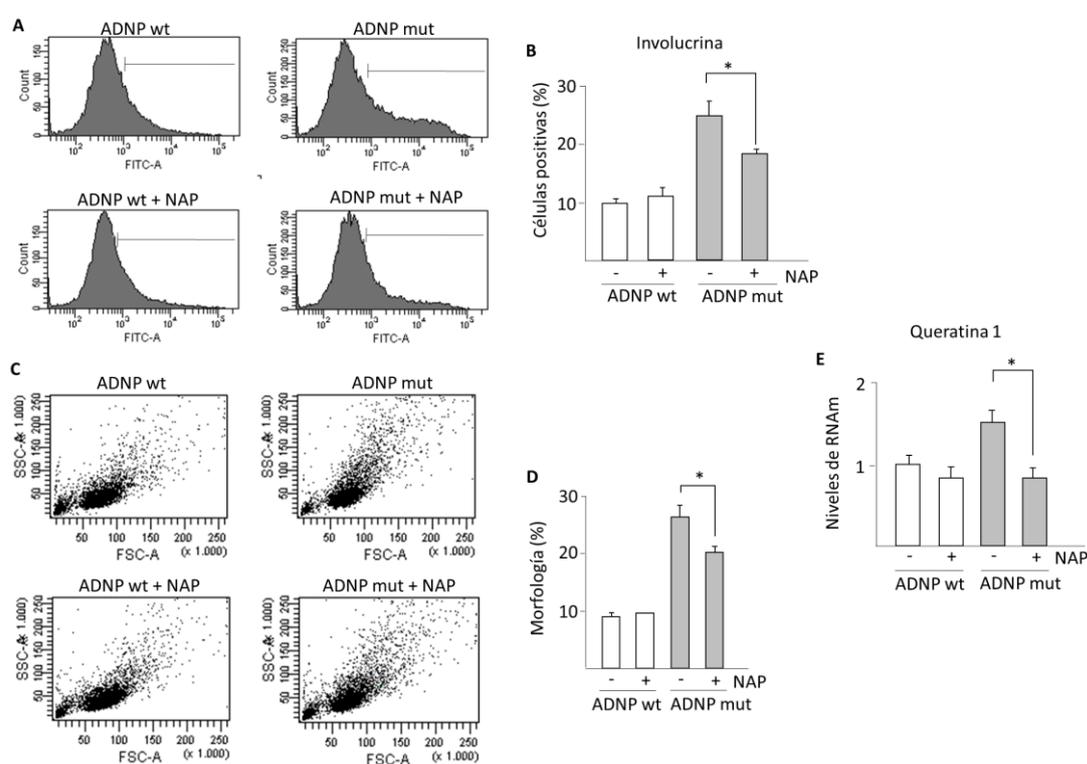


Figura R.11.- Estudio del efecto del péptido NAP sobre la diferenciación celular en queratinocitos de piel. A) Análisis de la expresión de involucrina mediante citometría de flujo. **B)** Cuantificación de la expresión de involucrina a partir de los datos obtenidos mediante citometría de flujo. **C)** Análisis del tamaño y la complejidad celular de los queratinocitos mediante citometría de flujo. **D)** Cuantificación del tamaño celular. **E)** Análisis de la expresión del RNA mensajero de la queratina 1 mediante RT-qPCR. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: células que presentan el alelo mutado. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística $*p < 0,05$.

Resultados

Aunque ya habíamos visto que el péptido NAP era capaz de disminuir la diferenciación en los queratinocitos que poseen la mutación en *ADNP*, decidimos estudiar también la expresión de los marcadores involucrina, queratina 1 y queratina 10, tras tratar los queratinocitos con el péptido, mediante un ensayo de inmunofluorescencia *in vitro* (Figura R.12). Una vez más, al estudiar la expresión de los tres marcadores de diferenciación, vimos que las células portadoras de la mutación en el gen *ADNP* poseían una mayor expresión de estas proteínas. Una vez que tratamos las células, tanto las del control como las obtenidas a partir de la paciente, vimos que la expresión de involucrina (Figuras R.12A y R.12B), disminuía de manera significativa ($p < 0,05$) tanto en el control como en las células mutadas. Aunque el descenso del porcentaje de células positivas para involucrina era mayor en los queratinocitos mutantes tratados respecto a los mutantes no tratados, observando un descenso de casi el 20 % (Figura R.12B).

En el caso de la expresión de queratina 10 (Figuras R.12C y R.12D), el resultado tras el tratamiento era similar: un descenso de la expresión de este marcador y con la misma significancia estadística ($p < 0,05$) tanto en células mutantes como no mutantes. En este caso, el descenso el porcentaje de células positivas mutadas tratadas respecto a las mutadas no tratadas no era tan grande como en el caso anterior, siendo en este caso un descenso del 7 %. En el caso del control, el descenso en la expresión del marcador era de un 2 %.

Por último, en el resultado que observamos respecto a la expresión de queratina 1 (Figura R.12E y R.12F), vemos el mismo resultado que en los inmunomarcajes anteriores. El descenso en la expresión de este marcador tras el tratamiento se produce de manera significativa ($p < 0,05$), siendo un descenso del 2 % en el control, y un descenso del 7 % en los queratinocitos mutantes.

Aunque en este experimento hemos observado un descenso de la expresión de los tres marcadores en el control, no hemos considerado el tratamiento con NAP como un elemento dañino para las células que no poseen la mutación, ya que es mediante esta técnica mediante la única que hemos observado este hecho, y con los experimentos anteriores, no vimos que el tratamiento afectara a la proliferación, ni vimos a las células fenotípicamente dañadas.

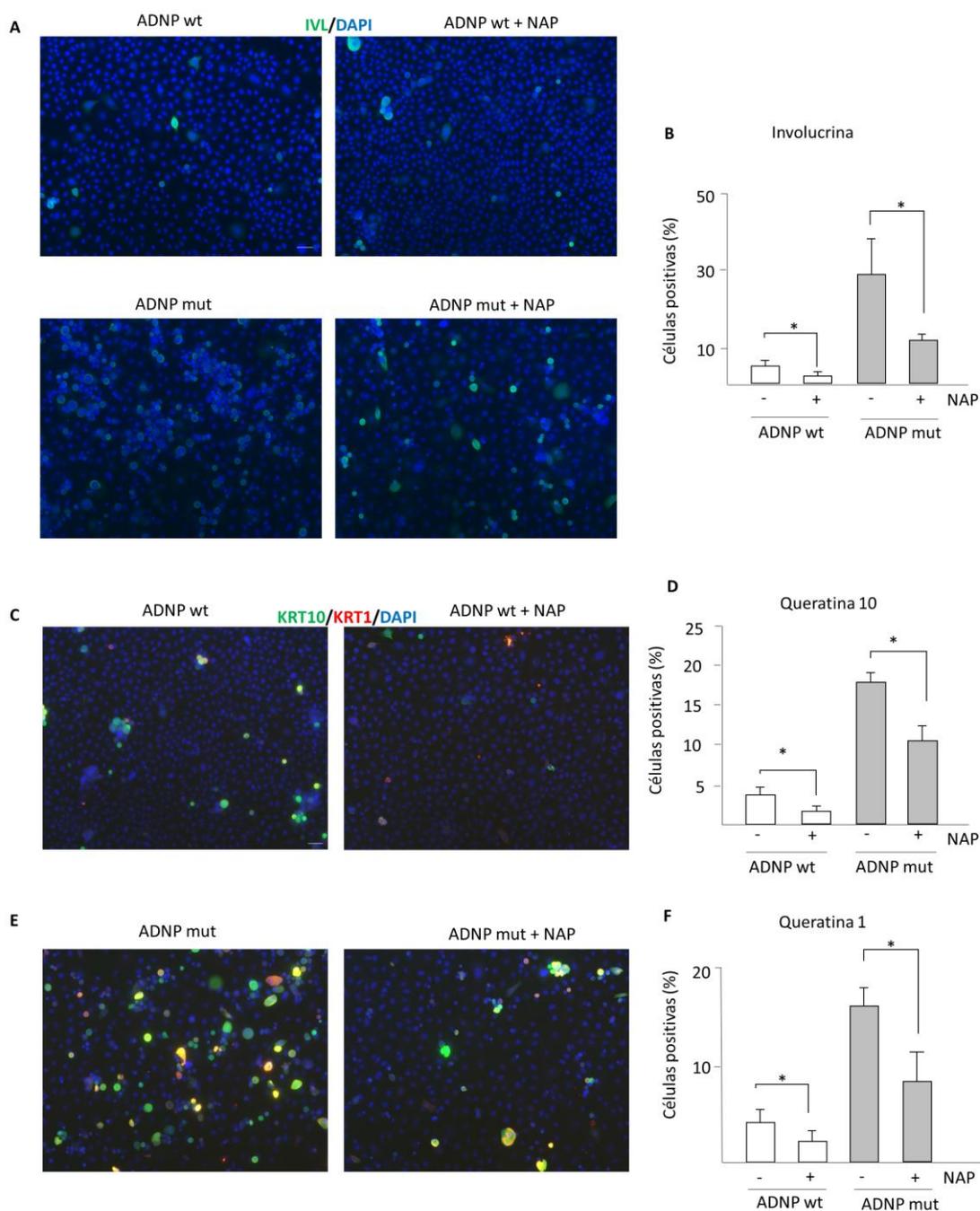


Figura R.12.- Expresión de diferentes marcadores de diferenciación terminal mediante inmunofluorescencia. A) Estudio de la expresión de involucrina. **B)** Cuantificación de la expresión de involucrina a partir de la inmunofluorescencia. **C)** Estudio de la expresión de queratina 10 (verde) y queratina 1 (rojo). **D)** Cuantificación de la expresión de queratina 10 a partir de la inmunofluorescencia. **E)** Cuantificación de la expresión de queratina 1 a partir de la inmunofluorescencia. ADNP wt: wild type, control; ADNP mut: células que presentan el alelo mutado. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística $*p < 0,05$. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala 50 μ m.

4.5.- Estudio de las características de la piel en un modelo de ratón en hemicigosis para *Adnp*

Para la realización de esta parte del proyecto, establecimos una colaboración con el laboratorio de la Dra. Illana Gozes de la Universidad de Tel Aviv, en Israel. La Dra. Gozes tiene una amplia experiencia en el estudio de ADNP. Su laboratorio es el responsable del descubrimiento tanto del gen *ADNP* como del péptido NAP (Bassan et al., 1999; Vulih-Shultzman et al., 2007; Zamostiano et al., 2001). Para sus trabajos en Alzheimer, han desarrollado un ratón que expresa *Adnp* en hemicigosis (recordemos que alteraciones en el gen *Adnp* en homocigosis, son letales en ratones). Gracias a esta colaboración, se han podido realizar estudios similares a los desarrollados en nuestro laboratorio sobre el paciente humano, pero empleando el modelo murino. Para ello, un miembro del laboratorio de la Dra. Gozes, Oxana Kapitansky, ha realizado los experimentos en ratones, guiados por nuestras indicaciones en cuanto al cultivo de fibroblastos de piel, los marcadores de diferenciación y anticuerpos a utilizar y los experimentos concretos que queríamos realizar. Los resultados del modelo murino, también forman parte de la publicación resultante de esta Tesis Doctoral. A continuación, se describen brevemente los resultados obtenidos en Israel mediante esta colaboración.

4.5.1.- Las células de la piel de los ratones que expresan *Adnp* en hemicigosis presentan una menor capacidad proliferativa que puede ser corregida mediante el tratamiento con el péptido NAP

Para realizar los estudios de proliferación celular, se obtuvieron fibroblastos a partir de colas de ratón. Se utilizaron ratones de fenotipo salvaje (wild type) y ratones que expresan *Adnp* en hemicigosis, es decir, que solo poseen una copia funcional del gen *Adnp*. Una vez aislados los fibroblastos, se estableció el cultivo celular. Para realizar los ensayos de proliferación celular (Figura R.13), se siguieron las mismas pautas que las empleadas en el caso de las células humanas. Al igual que en los fibroblastos humanos, los fibroblastos de ratón fueron tratados con el péptido NAP. La concentración empleada fue 180 nM. Con este experimento se obtuvieron dos resultados (Figura R.13): 1) Encontraron que los fibroblastos de ratón que poseen un déficit en la expresión de *Adnp*, presentan una capacidad proliferativa menor respecto a los fibroblastos de ratón con una expresión normal de dicho gen; 2) Al exponer a los fibroblastos a 180 nM del péptido NAP, en las células empleadas como control no se observó ningún efecto. Sin embargo, en los fibroblastos con déficit de expresión de *Adnp*, se encontró un ligero incremento de su capacidad proliferativa.

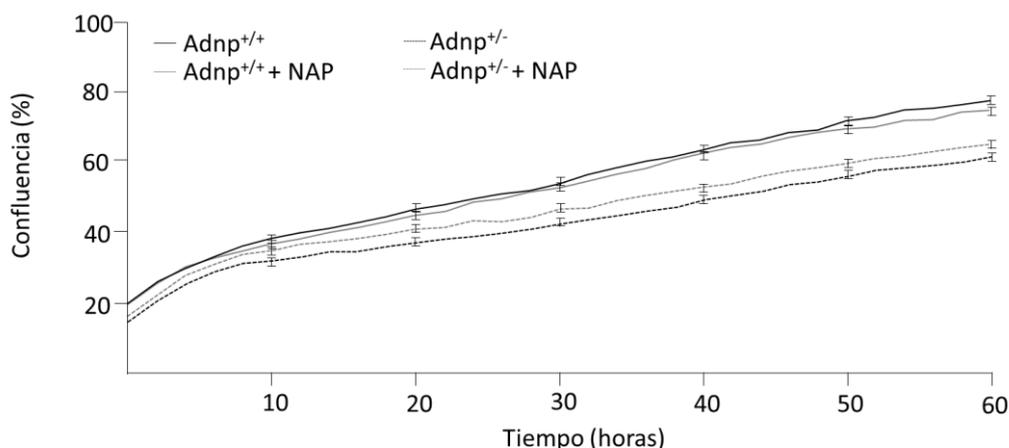


Figura R.13.- Curva de proliferación de fibroblastos de ratón. Cuantificación de la proliferación en fibroblastos de ratones con expresión normal de *Adnp* y de ratones con expresión deficiente de *Adnp*. Ambos grupos, también fueron tratados con NAP. Adnp^{+/+}: ratones con expresión normal de *Adnp*; Adnp^{+/-}: ratones con expresión deficiente de *Adnp*. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

4.5.2.- El péptido NAP disminuye la diferenciación en el modelo de ratón transgénico *in vivo*

En nuestro laboratorio, únicamente habíamos podido estudiar el efecto del péptido NAP *in vitro*, aunque las células empleadas en nuestros estudios, proceden de una paciente que poseen una mutación *de novo* en el gen *ADNP*. La ventaja que nos confirió esta colaboración, fue que se han podido realizar estudios similares *in vivo*. Para ello, en el laboratorio de la Dra. Gozes, trataron a los ratones con el péptido NAP y estudiaron el efecto producido sobre el animal.

De esta forma, se trató a un grupo de ratones con expresión deficiente de *Adnp* con el péptido durante 6 semanas. Como control, se estableció un grupo de ratones sin deficiencias en la expresión de *Adnp* y otro grupo con deficiencias en la expresión de dicho gen. Ambos grupos de ratones fueron tratados con placebo. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se obtuvieron secciones de piel de estos ratones y se estudió el estado de diferenciación de los queratinocitos de su epidermis. Siguiendo las pautas de nuestro laboratorio, se estudió la expresión de queratina 10 como marcador de diferenciación sobre secciones de piel. Se observó una mayor expresión de queratina 10 en los ratones con una expresión deficiente de *Adnp* respecto a los ratones empleados como control (Figura R.14A). Tras cuantificar la intensidad de fluorescencia, se corroboró que había una mayor expresión de este marcador en los ratones con expresión deficiente de *Adnp*. Además, este incremento de expresión era estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Figura R.14B). Como ya se ha mencionado, la ventaja de este modelo es poder tratar *in vivo* a los ratones con el péptido y poder estudiar si se revierten los defectos encontrados. Por tanto, también se estudió la

Resultados

diferenciación en secciones de piel de ratones deficientes en *Adnp* que habían sido tratados con NAP (Figura R.14B). Se observó que, tras el tratamiento, la expresión de queratina 10 disminuía de forma significativa ($p < 0,01$), alcanzando los niveles de fluorescencia de los controles.

Otro dato que se estudió fue el grosor de la epidermis (Figura R.14C). En estos animales, se encontró que aquellos que presentan la deficiencia de expresión del gen, presentaban una epidermis más fina respecto a los controles, habiendo más de tres micras de diferencia ($p < 0,001$). Cuando cuantificaron el grosor de la epidermis tras el tratamiento con el péptido, vieron que el grosor en los ratones deficientes tratados incrementaba respecto a los no tratados. Este incremento del grosor era de nuevo estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

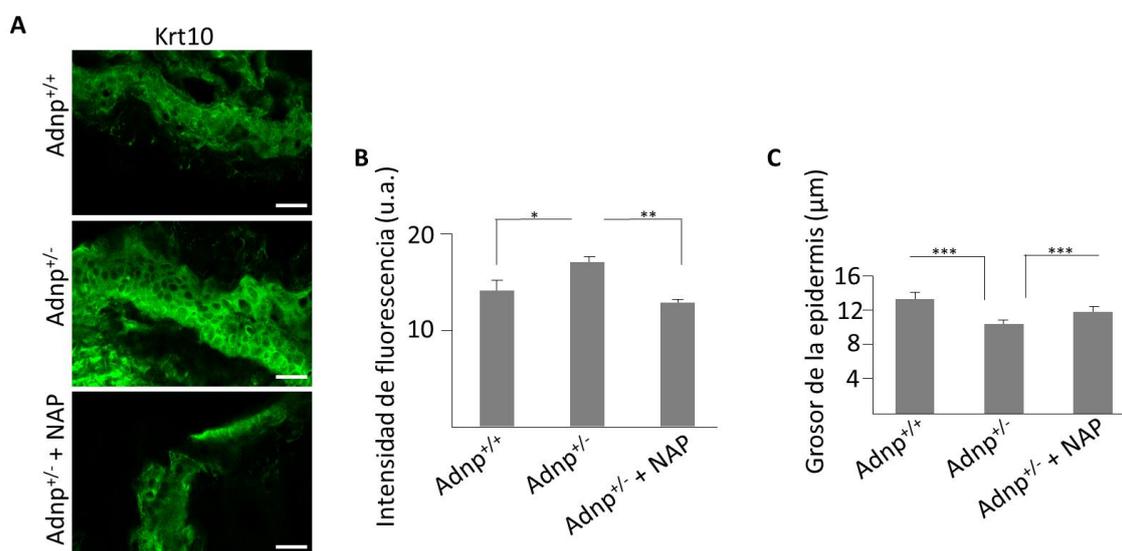


Figura R.14.- Estudio de la diferenciación en el modelo animal. A) Inmunofluorescencia en secciones de piel de ratones para estudiar la expresión de queratina 10. B) Cuantificación de la expresión de queratina 10. C) Cuantificación del grosor de la epidermis. *Adnp*^{+/+}: ratones con expresión normal de *Adnp*; *Adnp*^{+/-}: ratones con expresión deficiente de *Adnp*. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barra de escala 25 μm .

Tras comprobar que estos resultados en el ratón coincidían con nuestros resultados en las células obtenidas de la paciente, y siguiendo las mismas pautas que nosotros, estudiaron la expresión de ciclina A (Figura R.15A). Encontraron que los ratones deficientes para *Adnp* presentaban una mayor expresión de esta proteína. Cuando cuantificaron la intensidad de fluorescencia del inmunomarcaje (Figura R.15B), comprobaron que la expresión de ciclina A era significativamente mayor ($p < 0,05$) en los ratones deficientes respecto a los controles. También realizaron el marcaje con

ciclina A en las secciones de piel procedentes de los ratones deficientes tratados con NAP (Figura R.15A). Tras cuantificar la expresión de esta proteína (Figura R.15B), observaron que, tras el tratamiento, la expresión de ciclina A disminuía de forma significativa ($p < 0,01$).

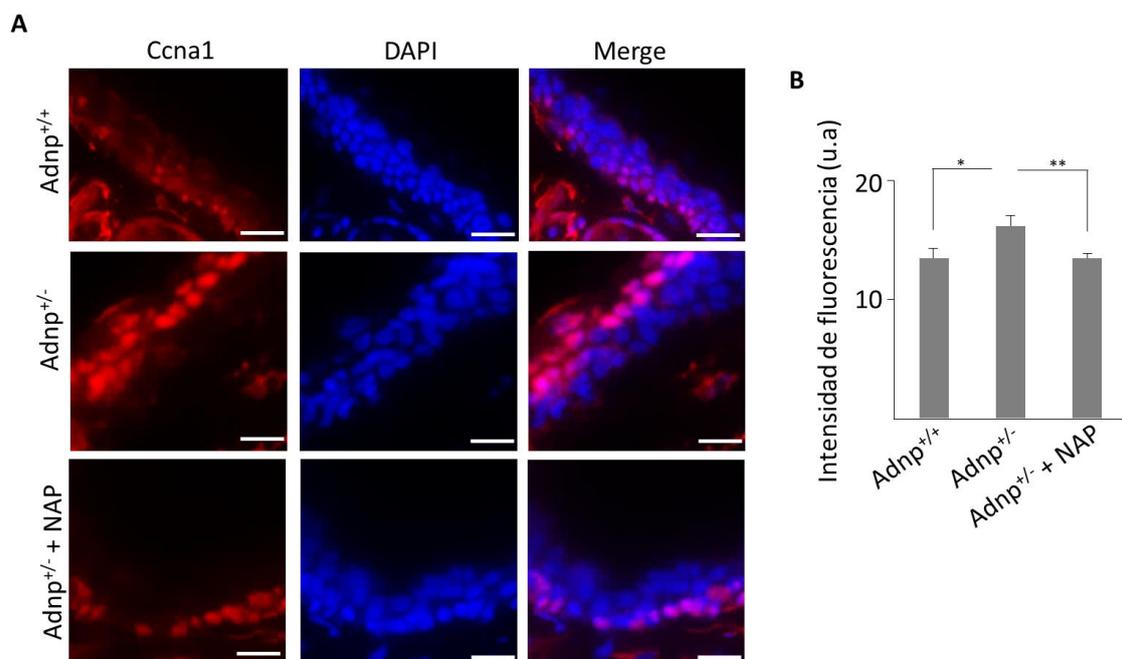


Figura R.15.- Estudio de la expresión de ciclina A en el modelo animal. A) Inmunofluorescencia para estudiar la expresión de ciclina A en secciones de piel de ratones. **B)** Cuantificación de la expresión de ciclina A. Adnp^{+/+}: ratones con expresión normal de *Adnp*; Adnp^{+/-}: ratones con expresión deficiente de *Adnp*. Los histogramas representan los valores promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala 15 μ m.

4.6.- Establecimiento de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) como modelo celular para el estudio del Síndrome ADNP

Además de los modelos celulares utilizados anteriormente para el estudio de los efectos producidos por la mutación en el gen *ADNP*, optamos por buscar un modelo celular que se pudiera originar a partir de una muestra de sangre, y a partir de la cual pudiéramos generar otros tipos celulares. Este modelo celular consistió en la generación de células madre pluripotentes inducidas. A partir de estas células, se puede inducir la diferenciación hacia diferentes linajes, sobre los que se puede estudiar el efecto de la mutación en ADNP. Para la generación de este modelo celular, establecimos una

colaboración con el Dr. Pedro J. Real Luna, investigador del Centro de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) en Granada. La doctoranda que firma esta Tesis se desplazó al laboratorio de GENYO para conocer los procedimientos y verificar la presencia de la mutación en las células generadas, aunque la mayor parte de las manipulaciones celulares fueron llevadas a cabo por personal altamente experimentado del laboratorio de reprogramación celular en GENYO.

4.6.1.- Obtención y caracterización de células madre pluripotentes inducidas a partir de linfocitos

La reprogramación celular se realizó a partir de una muestra de sangre periférica de la paciente. Además, de reprogramar las células de la paciente, también se realizó la reprogramación celular a partir de sangre periférica de la madre de la paciente. De esta forma se obtuvo un control sin la mutación que porta nuestra paciente, pero lo más parecido genéticamente a ella. De esta forma, mediante la obtención de linfocitos a partir de las muestras de sangre, se llevó a cabo la reprogramación celular. Para ello, los linfocitos fueron expuestos a las partículas virales mediante la utilización del kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0, el cual es un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai (Lopez-Onieva et al., 2016, 2017). Este kit incluye los genes de reprogramación *KLF4*, *OCT3/4*, *SOX2* y *c-MYC*. Tras realizar la reprogramación y acondicionar las células reprogramadas al medio de cultivo adecuado (Lopez-Onieva et al., 2016, 2017), se obtuvieron clones procedentes tanto del control como de la paciente (Figura R.16). Una vez obtenidas suficientes colonias, se procedió con la congelación de células para crear un repositorio. Posteriormente, se realizó la caracterización celular y molecular de estas células con el objetivo de comprobar que efectivamente se trataba de células madre pluripotentes inducidas (Lopez-Onieva et al., 2016, 2017).

Para la caracterización celular y molecular de las iPSCs, se realizaron varios análisis (como en Lopez-Onieva et al., 2016, 2017; Ramos-Mejía et al., 2012). La primera prueba que se realizó consistió en un test de pluripotencia. Para ello, se analizaron mediante PCR la expresión de varios genes característicos de las células pluripotentes: *SOX2*, *REX1*, *NANOG* y *OCT4* en ambas líneas celulares, siendo el resultado positivo para la expresión de estos genes. También se estudió la capacidad de estas células para diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* hacia las tres hojas embrionarias. Para ello, mediante inmunohistoquímica, se estudió la expresión de proteínas características de estas tres hojas embrionarias: β -III-tubulina (ectodermo), vimentina (mesodermo) y citoqueratinas AE1 y AE3 (endodermo), siendo la expresión de estas proteínas positiva en ambas líneas celulares para los dos tipos de diferenciación inducidos (*in vitro* e *in vivo*). Entre las pruebas de caracterización también se realizó un estudio del cariotipo, siendo el resultado el de un cariotipo femenino normal, y un estudio de la expresión de microsatélites y regiones repetidas en tándem que garantizaron que el origen de las líneas celulares generadas era el correcto. Por último, mediante PCR, se comprobó la

eliminación de los vectores de reprogramación, lo cual asegura que los genes introducidos para la reprogramación, no se han insertado en el genoma de las células.

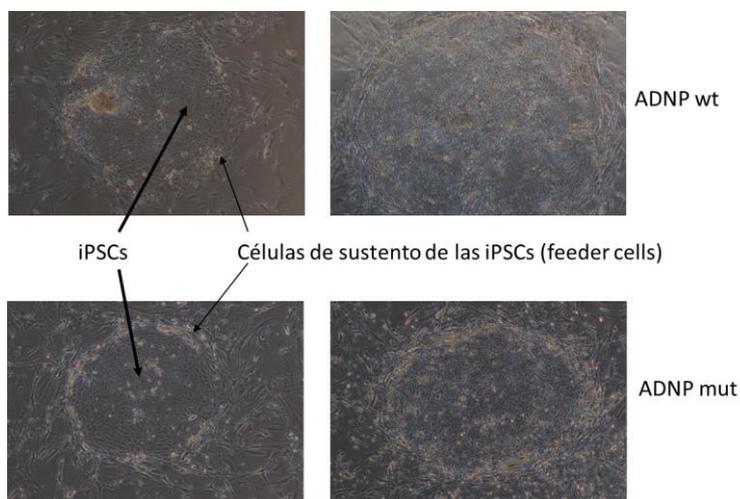


Figura R.16.- Colonias de células reprogramadas. En la parte superior podemos observar colonias de iPSCs obtenidas a partir de la muestra de sangre del control (ADNP wt). En la parte inferior podemos observar colonias de iPSCs obtenidas a partir de la muestra de sangre de la paciente (ADNP mut).

Para completar la caracterización, realizamos la comprobación de que las iPSCs generadas a partir de los linfocitos de la paciente presentaran la mutación en el gen *ADNP*. Para ello, al igual que hicimos con el modelo celular de piel, realizamos una PCR alelo-específica (Figura R.17). Mediante esta PCR confirmamos que las iPSCs generadas a partir de los linfocitos empleados como control, únicamente expresaban el alelo no mutado, mientras que las iPSCs de la paciente expresan tanto el alelo no mutado como el mutado.

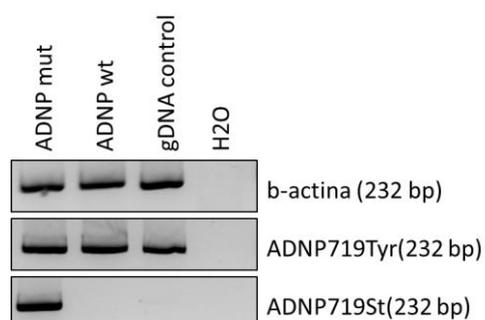


Figura R.17.- Estudio mediante RT-PCR de la expresión de la mutación en ADNP. Estudio mediante PCR alelo-específica de la expresión del alelo mutante en las líneas celulares generadas. ADNP wt: iPSCs control; ADNP mut: iPSCs procedentes de la paciente portadora de la mutación en *ADNP*.

4.6.2.- Diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas obtenidas hacia neuronas

Dado que el gen *ADNP* se encuentra íntimamente ligado al neurodesarrollo (como se ha explicado en la introducción de esta Tesis Doctoral), nuestra intención fue desde el principio poder diferenciar las iPSCs generadas hacia progenitores neurales. Para la realización de esta parte del proyecto contamos con la colaboración de la Dra. Elena González Muñoz, investigadora del Laboratorio Andaluz de Reprogramación Celular (LARCEL) en Málaga, la cual nos ayudará con la diferenciación. Posteriormente, realizaremos una caracterización de la diferenciación hacia los diferentes tipos de células del sistema nervioso, para estudiar cómo afecta la mutación en el gen *ADNP* al desarrollo del sistema nervioso.

DISCUSIÓN

5.- Discusión

5.1.- Estudio genético

Previo al inicio de esta Tesis, se le habían realizado a la paciente diversos estudios genéticos en el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, con el objetivo de obtener un diagnóstico que explicara la sintomatología presentada. Al realizar estos estudios, siempre se pensó en que debía existir un defecto congénito de base genética. Además, la causa genética debería ser alguna mutación autosómica recesiva o *de novo*. Entre estos estudios se descartó un posible Síndrome de Rett, ya que no se identificó en la paciente ninguna de las ocho mutaciones en el gen *MECP2* que pueden causar este síndrome. Ya dentro del contexto de esta Tesis Doctoral, se realizaron una serie de estudios moleculares, ya que existía la sospecha clínica de un posible Síndrome APECED (OMIM# 240300) como causa genética. Este síndrome es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *AIRE*. Una vez más, se pensó en esta enfermedad dado que las manifestaciones clínicas típicas del APECED coincidían en parte con las presentadas por la paciente. Entre los síntomas que encajaban con este diagnóstico se encontraban la presencia de candidiasis recurrentes y la aparición de endocrinopatías autoinmunes. El gen *AIRE* es un regulador transcripcional de otros genes (Cervato et al., 2009), actuando en el desarrollo y maduración de los linfocitos T. Pero, tras analizar la presencia de mutaciones en el gen *AIRE* en la paciente mediante un CGH array, se confirmó que no existía ninguna mutación en dicho gen. Sin embargo, mediante el CGH array sí se encontró una región duplicada en el cromosoma 21, concretamente en la posición 21q22.3. En esta duplicación se encuentra codificado el gen *LINC00315* (C21orf93). Este gen no codifica para proteína, sino que codifica para un ARN regulador que no se expresa a nivel de proteína. Hasta la fecha, no se ha encontrado ninguna asociación entre este gen y ninguna patología. Esta duplicación no se había visto en los padres de la paciente.

Decidimos realizar la secuenciación del exoma mediante el estudio Trio. Tras el filtrado de los datos obtenidos mediante la secuenciación, obtuvimos 7 genes que presentaban mutaciones. Pero únicamente la mutación en el gen *ADNP* era una mutación *de novo* que se encontraba ligada al Síndrome del Espectro Autista. Además, esta mutación era la única que conllevaba un cambio en el marco de lectura de la proteína debido a la inserción de un nucleótido, para finalmente dar lugar a una aparición prematura de un codón de fin en la proteína. Pese a este dato, no estaba descrito en la base de datos PolyPhen cual podría ser el efecto de la mutación a nivel proteico. Por otro lado, respecto a la mutación en el gen *ADNP* no se conocía cual era la frecuencia alélica del cambio en la población general. Estas razones convirtieron a este gen en nuestro principal candidato como causante de las manifestaciones clínicas presentadas por la paciente. En los últimos años, y dentro de los trabajos cuyo objetivo era la identificación de nuevos genes causantes del Autismo, se han identificado una serie de mutaciones *de novo* en la proteína neuroprotectora dependiente de actividad (*ADNP*) (O’Roak et al., 2012; Roak et al., 2012). Finalmente, y gracias a las técnicas de

secuenciación, se identificaron 10 pacientes con mutaciones en el gen *ADNP* (Helsmoortel et al., 2014). Entre las que se encontraba la mutación que encontramos en nuestra paciente.

Estos 10 pacientes, todos ellos niños, presentaban unas manifestaciones clínicas comunes entre ellos. El estudio de estos 10 pacientes, ampliado actualmente a un estudio mayor que incluye 78 pacientes diagnosticados con estas mutaciones, ha dado lugar a la descripción del Síndrome ADNP (OMIM# 615873) junto con sus manifestaciones clínicas (Van Dijck et al., 2018). De todas las manifestaciones clínicas descritas para este síndrome, no todas son compartidas por todos los pacientes. En el caso de nuestra paciente, las manifestaciones compartidas con el resto son: una frente prominente con una línea de nacimiento del cabello alta, un puente nasal ancho, baja estatura, deficiencias hormonales, características autistas, problemas gastrointestinales, problemas de cadera e infecciones recurrentes. Dadas todas las manifestaciones clínicas descritas hasta el momento, y conocidas las manifestaciones clínicas presentadas por nuestra paciente a lo largo de su vida, podemos concluir que encaja como paciente del Síndrome ADNP. Además, si recordamos lo mencionado anteriormente, los ratones que expresan *Adnp* en heterocigosis, también presentan un retraso en el desarrollo, y problemas cognitivos (Gozes & Ivashko-Pachima, 2015), lo cual se ha observado en el conjunto de pacientes estudiados.

5.2.- Efectos de la mutación en *ADNP* sobre las funciones celulares

Entre todos los síntomas descritos hasta el momento en los pacientes con Síndrome ADNP, no se habían descrito problemas en la piel de estos niños. Tras tener la posibilidad de consultar a ocho padres de niños con el mismo defecto congénito, seis de ellos nos han referido un retraso en la cicatrización de heridas si se compara este proceso con niños sanos. En la literatura se encuentra descrito que ADNP es esencial para la formación del cerebro (Pinhasov et al., 2003). También se encuentra descrito que mutaciones en la expresión de ADNP se asocia con un retraso en el desarrollo del cerebro (Gozes, Patterson, Van Dijck, Kooy, Peeden, Eichenberger, 2017). En relación con estas evidencias, también se ha descrito que mutaciones en *ADNP* que conllevan a una disminución del grosor del esmalte dental (Gozes et al., 2017). Nosotros describimos en este trabajo que la mutación en *ADNP* conlleva hacia un menor grosor de la epidermis. En este punto hay que mencionar que el cerebro, el esmalte de los dientes y la epidermis tienen un mismo origen embrionario, ya que los tres tejidos derivan del ectodermo.

Durante el desarrollo de este trabajo, hemos implantado un modelo celular *in vitro* que permite estudiar la alteración provocada por la mutación en *ADNP*. Tras aislar y establecer el cultivo de los queratinocitos y de los fibroblastos a partir de una biopsia de piel, observamos que ambos tipos celulares presentaban una menor capacidad

proliferativa si se comparaba con queratinocitos y fibroblastos que no portan la mutación. Una de las etapas clave durante el proceso de la cicatrización de heridas, es el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos (Cheng et al., 2016). A su vez, el menor grosor de la epidermis observado es consistente con la menor capacidad proliferativa de los queratinocitos mutantes. También hemos encontrado que el grosor de la capa córnea de la epidermis era mayor en la paciente respecto a los controles, lo cual se denomina hiperqueratosis y suele conllevar una descamación excesiva de la piel, como es el caso de la paciente en regiones periarticulares. Este mayor engrosamiento de la capa córnea podría ser resultado de la hipotrofia que se produce en la capa basal de la epidermis, de forma que se proporcionaría un mecanismo para el mantenimiento de la homeostasis de la piel. La homeostasis de la piel se consigue manteniendo un equilibrio entre la proliferación de las células de la capa basal, la diferenciación de los queratinocitos y la descamación de las células diferenciadas. Es decir, al existir una menor proliferación de las células del estrato basal, y una mayor diferenciación de los queratinocitos, se obtiene como resultado una epidermis delgada con una tasa de reposición celular demasiado baja. El déficit proliferativo podría llevar a una menor tasa de renovación de la piel y al acúmulo de células en la capa córnea que hemos observado. De esta forma se puede proporcionar un mecanismo de protección de la piel a pesar de la hipotrofia de la capa basal.

En nuestro modelo celular, hemos encontrado una mayor expresión de ciclina A en las células portadoras de la mutación. La ciclina A se expresa durante la fase G2 del ciclo celular, y su expresión puede llegar a detectarse hasta la pro-metáfase. Posteriormente, la proteína es degradada. En base al acúmulo de ciclina A en las células mutantes de la epidermis, podemos deducir estas células se encuentran mayoritariamente en la transición G2/M. Cuando los queratinocitos se encuentran en mitosis, hasta la metafase, expresan ciclina B (Müller, 1995; Murray, 2004). Sin embargo, no hemos encontrado células positivas para la expresión de esta ciclina en la piel de la paciente. Basándonos en estas observaciones, podemos pensar que las células mutantes no entrarían en mitosis, sino que se quedarían retenidas en la fase G2/M del ciclo celular. El acúmulo de la ciclina A y la ausencia de expresión de ciclina B nos hacen pensar que ADNP puede tener un papel en la mitosis. Esto podría ser extrapolable al ciclo celular de otras células del organismo.

La conexión entre un bloqueo en G2/M y el inicio de la diferenciación terminal (Zanet et al., 2010) se ha demostrado de forma funcional (Freije et al., 2014; Freije et al., 2012; Molinuevo et al., 2016). Estas evidencias coinciden con lo observado en las células que presentan una mutación en *ADNP*. Hemos visto que se produce una parada de su ciclo celular en la fase G2/M, a la vez que hemos encontrado que estas células portadoras de la mutación se encuentran más diferenciadas.

También hemos encontrado un patrón de expresión atípico de la fosfo-histona H3. Esta proteína, detecta la cromatina altamente condensada (Hendzel et al., 1997). El patrón de expresión esperado es un patrón punteado que se corresponde con los cromosomas condensados durante la metafase. Sin embargo, en las células portadoras

de la mutación en *ADNP* vimos que los cromosomas no se encuentran condensados como debieran. Por tanto, los resultados sugieren un posible fallo en la segregación de los cromosomas durante la mitosis.

5.3.- Posible mecanismo de acción de ADNP sobre el ciclo celular

Como está ampliamente descrito en la literatura, los microtúbulos juegan un papel importante durante la condensación y segregación de los cromosomas en la metafase. Basándonos en los resultados que hemos obtenido respecto a la condensación de los cromosomas en las células portadoras de la mutación, podríamos pensar que esta mutación en *ADNP* conllevaría a un defecto en la reorganización de los microtúbulos. De esta forma, el defecto en la segregación de los cromosomas podría conducir a un bloqueo en la fase G2/M, lo cual parece producirse en las células portadoras de la mutación.

El bloqueo en la fase G2/M evita el avance hacia las siguientes fases del ciclo celular, es decir, hacia la mitosis, lo cual también observamos mediante la deficiencia de expresión de la ciclina B. Está demostrado que un bloqueo prolongado de la mitosis potencia la diferenciación de los queratinocitos (Freije et al., 2012). De esta forma podríamos explicar el mecanismo mediante el cual *ADNP* participa en la regulación de la mitosis (Figura D.1), ya que, además se produce una menor proliferación y, en el caso de los queratinocitos, conduce a estas células hacia una diferenciación terminal escamosa. Esto conllevaría una pérdida celular, que explicaría el menor grosor de la epidermis, y finalmente un mal funcionamiento de la piel como barrera protectora o en el proceso de cicatrización, ya que, para este último, es necesario la regeneración de la epidermis. Como hemos mencionado, la piel podría llevar a cabo un mecanismo de protección de la homeostasis mediante el engrosamiento de la capa córnea.

Los estudios actuales sugieren que *ADNP* interacciona con los microtúbulos mediante su asociación con la tubulina a través del dominio NAP (Divinski et al., 2004). Concretamente, dicha interacción se produciría a través de la unión con las proteínas de unión a los microtúbulos (EBs). Las proteínas de unión a microtúbulos es una familia formada por tres miembros: EB1, EB2 y EB3. EB3 se expresa en cerebro y participa en la dinámica de formación de microtúbulos (Nakagawa et al., 2000; Stepanova et al., 2003). EB3 se localiza predominantemente dentro del compartimento dendrítico y ha sido caracterizado como el mayor regulador de la plasticidad de las espinas dendríticas, influyendo en las dinámicas de la actina dentro de la espina dendrítica (Geraldo, Khanzada, Parsons, Chilton, & Gordon-Weeks, 2008; Gu et al., 2006; Jaworski et al., 2009). La proteína EB1 está implicada en el transporte axonal (Gu et al., 2006). Las proteínas EB3 y EB1 forman un dímero cuya función es promover el crecimiento constante de los microtúbulos para evitar posibles catástrofes en la célula (Komarova,

Lansbergen, Galjart, Grosveld, Borisy, 2005). De esta forma, el dímero EB3/EB1 es capaz de incrementar el número de neuritas en las células del feocromocitoma (células PC12).

Como ya se ha mencionado en la introducción, la proteína ADNP interacciona con la proteína HP1 α . Durante la metafase, la proteína HP1 α se localiza en la región centromérica, concretamente en el cinetocoro. Se ha descrito que HP1 α contribuye a la estabilidad y cohesión de las cromátidas hermanas durante la metafase (Hayakawa, 2003). También se sabe que las funciones mitóticas de esta proteína vienen marcadas por las modificaciones post-traduccionales que sufre la proteína (Chakraborty, Prasanth, & Prasanth, 2014). En *Drosophila melanogaster* se ha visto que HP1 α es esencial para el mantenimiento de la transcripción de los genes diana del factor de transcripción E2F, es decir, de aquellos genes implicados en la progresión del ciclo celular. Si se produce una depleción de la proteína HP1 α , se produce un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular, junto con una incorrecta segregación de los cromosomas. A su vez, se ven afectados la distribución cromosómica de Aurora B y la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 (De Lucia, Ni, Vaillant, & Sun, 2005).

Teniendo en cuenta la interacción descrita entre ADNP y HP1 α , podemos pensar que una menor expresión o actividad de ADNP puede conllevar hacia una menor interacción entre HP1 α y ADNP. Basándonos en los efectos que produce la depleción de la proteína HP1 α , los cuales son similares a los observados en las células portadoras de la mutación en *ADNP*, podemos hipotetizar sobre el posible mecanismo mediante el cual ADNP participa en el ciclo celular. Durante la progresión del ciclo celular, si la función de HP1 α dependiera de su interacción con ADNP, al no haber una correcta expresión de ADNP, esta no podría unirse a HP1 α , de forma que esta última no podría realizar su función en el centrómero, por lo que no se produciría un anclaje correcto de los microtúbulos en el cinetocoro, y, por tanto, un bloqueo en G2/M junto con una segregación incorrecta de los cromosomas. Al estudiar los genes diana de ADNP, cuando la expresión de este gen se encuentra disminuida, se produce una disminución de la actividad del promotor de E2F. Al disminuir la actividad del promotor de E2F, los genes regulados por este factor de transcripción no se transcribirían, de forma que no se activaría el ciclo celular, produciéndose una menor proliferación celular. Por tanto, podríamos pensar que se está produciendo una menor activación del ciclo celular, y que cuando las células comienzan a proliferar, los defectos durante la segregación de los cromosomas, conllevan hacia una diferenciación en queratinocitos.

La proteína HP1 α se postula como el mejor candidato para la facilitar la unión de ADNP a la cromatina debido a las funciones y asociaciones que se han descrito sobre ella: 1) Participa en el reclutamiento de la heterocromatina (Cammass, Herzog, Lerouge, Chambon, & Losson, 2004); 2) Interactúa con la heterocromatina centromérica durante la división celular (en la metafase) (Hayakawa, 2003); 3) Está asociada con el silenciamiento de los genes diana del factor de transcripción E2F, ya que además se produce una deficiencia en la expresión de los genes diana de E2F cuando existe una deficiencia de expresión de ADNP (Williams et al., 2003).

5.4.- Efecto del tratamiento con el péptido NAP y posible mecanismo de acción

Este péptido se ha identificado como un agente neuroprotector tanto en modelos animales como en cultivos celulares. En cultivos celulares, se ha comprobado que NAP ejerce un efecto protector frente a la toxicidad producida mediante el bloqueo eléctrico, frente a las consecuencias producidas por el estrés oxidativo o a las producidas por la privación de nutrientes. A su vez, tras la administración de este péptido de forma crónica a ratones knockout para *Adnp*, los cuales muestran déficits en la memoria a corto plazo, se ha visto que la memoria a corto plazo mejora (Vulih-Shultzman et al., 2007). En estudios realizados en neuronas cuyos niveles de expresión de *ADNP* están alterados, se ha observado una relación entre el péptido NAP y la reorganización de la red de microtúbulos, de forma que se promueve el crecimiento de las neuritas tras el tratamiento (Divinski et al., 2006). Por tanto, y como se ha mencionado arriba, *ADNP* interactuaría con los microtúbulos a través del dominio NAP (Furman et al., 2004).

Las proteínas de unión a los microtúbulos (EBs) utilizan el péptido Ser-X-Ile-Pro (SxIP) como señal para la localización del final del microtúbulo (Honnappa et al., 2009). Curiosamente, cuando se identificó el péptido NAP, se encontró que este octapéptido contiene un motivo SIP (Bassan et al., 1999). El motivo SxIP se encuentra altamente conservado entre las diferentes proteínas de unión a microtúbulos ya que se trata de un sitio de interacción. Dado que el péptido NAP posee también este motivo, se han realizado diferentes experimentos para comprobar si existe una interacción entre NAP y las proteínas de unión a microtúbulos. De esta forma se podría explicar cómo NAP interactúa con los microtúbulos y ejerce su función neuroprotectora. Se ha confirmado la unión entre NAP y EB3 (Oz et al., 2014). Por tanto, la proteína EB3 es una diana directa para NAP, y se ha confirmado que su interacción esta mediada por la unión al motivo SxIP.

Se han realizado diversos estudios en células neuronales para tratar de comprender cómo NAP ejerce su efecto protector mediante su interacción con los microtúbulos. Mediante la intoxicación con zinc de células de la glía (Divinski et al., 2004) y de neuronas (Divinski et al., 2006), se produce la inducción de cambios estructurales en la red de microtúbulos de estas células. Estos cambios en la organización de los microtúbulos llevan hacia una mayor mortalidad celular debido a la intoxicación. Sin embargo, si a estas mismas células se les añade el péptido NAP, se produce una inhibición de estos cambios estructurales, incrementándose también la supervivencia celular (Divinski et al., 2006). Tras la intoxicación con zinc, también se han realizado estudios para comprobar el efecto sobre el pool de microtúbulos. Se observó que se producía una reducción de la polimerización de la tubulina respecto a las células no intoxicadas. Tras tratar estas células con el péptido NAP, se encontró que se producía una restauración del pool de microtúbulos polimerizados (Saar Oz et al., 2012). También se ha visto que NAP proporciona protección a las células neuronales, ya sea en presencia

o ausencia de células de la glía, cuando las neuronas son expuestas a múltiples toxinas como el péptido β -amiloide (Michaelis et al., 2005).

Basándonos en estos estudios, decidimos añadir el péptido NAP a nuestras células. Lo que nos encontramos al tratar los queratinocitos y los fibroblastos con este compuesto, fue un incremento de la capacidad proliferativa de las células portadoras de la mutación. A su vez, también observamos una disminución de la expresión de los marcadores de diferenciación en queratinocitos. Por tanto, obtuvimos una evidencia de que el péptido NAP es capaz de incrementar la capacidad proliferativa y disminuir la diferenciación en células portadoras de la mutación en el gen *ADNP*.

Para estudiar el efecto producido por el péptido sobre la regulación del ciclo celular, optamos por la utilización de un modelo animal. Para el estudio de la expresión de las proteínas implicadas en el ciclo celular, la mejor manera de observar si existía algún efecto con el tratamiento con NAP era mediante el estudio *in vivo*. Mediante la colaboración establecida con el laboratorio de la Dra. Illana Gozes en la Universidad de Tel-Aviv, pudimos realizar los estudios *in vivo*. Dado que el gen *ADNP* se encuentra conservado a lo largo de la evolución, y que su secuencia de este gen en el ratón presenta una identidad del 90 % con la secuencia del gen humano, los estudios realizados en este modelo son comparables con los realizados en células humanas. Estos animales, al poseer una expresión parcial del gen *Adnp*, presentan deficiencias cognitivas y de memoria. En el modelo animal, volvimos a tener evidencias de una implicación de *ADNP* en el desarrollo del ciclo celular. Mediante este modelo, pudimos comprobar que, tras la administración del péptido, se producía una disminución de la expresión de los marcadores de diferenciación junto con una disminución de la expresión de la ciclina A. A su vez, el grosor de la epidermis también sufría un incremento.

Tras ver los resultados producidos tras la administración del péptido, en los cuales se produce una corrección de los defectos producidos por la menor expresión de *ADNP*, podemos afianzar nuestra hipótesis sobre el papel de *ADNP* en el ciclo celular. Tras el tratamiento con el péptido NAP, vemos que los defectos observados se corrigen, al menos en parte. No es descabellado pensar que, pese a un defecto de expresión de *ADNP*, la sola presencia del dominio NAP interaccione con los microtúbulos. De esta forma, el tratamiento con NAP, corregiría o revertiría al menos en parte, los defectos producidos en el ciclo celular por la menor expresión de *ADNP*. El mecanismo mediante el cual actuaría NAP, sería mediante su interacción con los microtúbulos, produciéndose una correcta segregación de los cromosomas, evitándose el bloqueo en la fase G2/M, de forma que los queratinocitos no iniciarían el proceso de diferenciación terminal escamosa (Figura D.1).

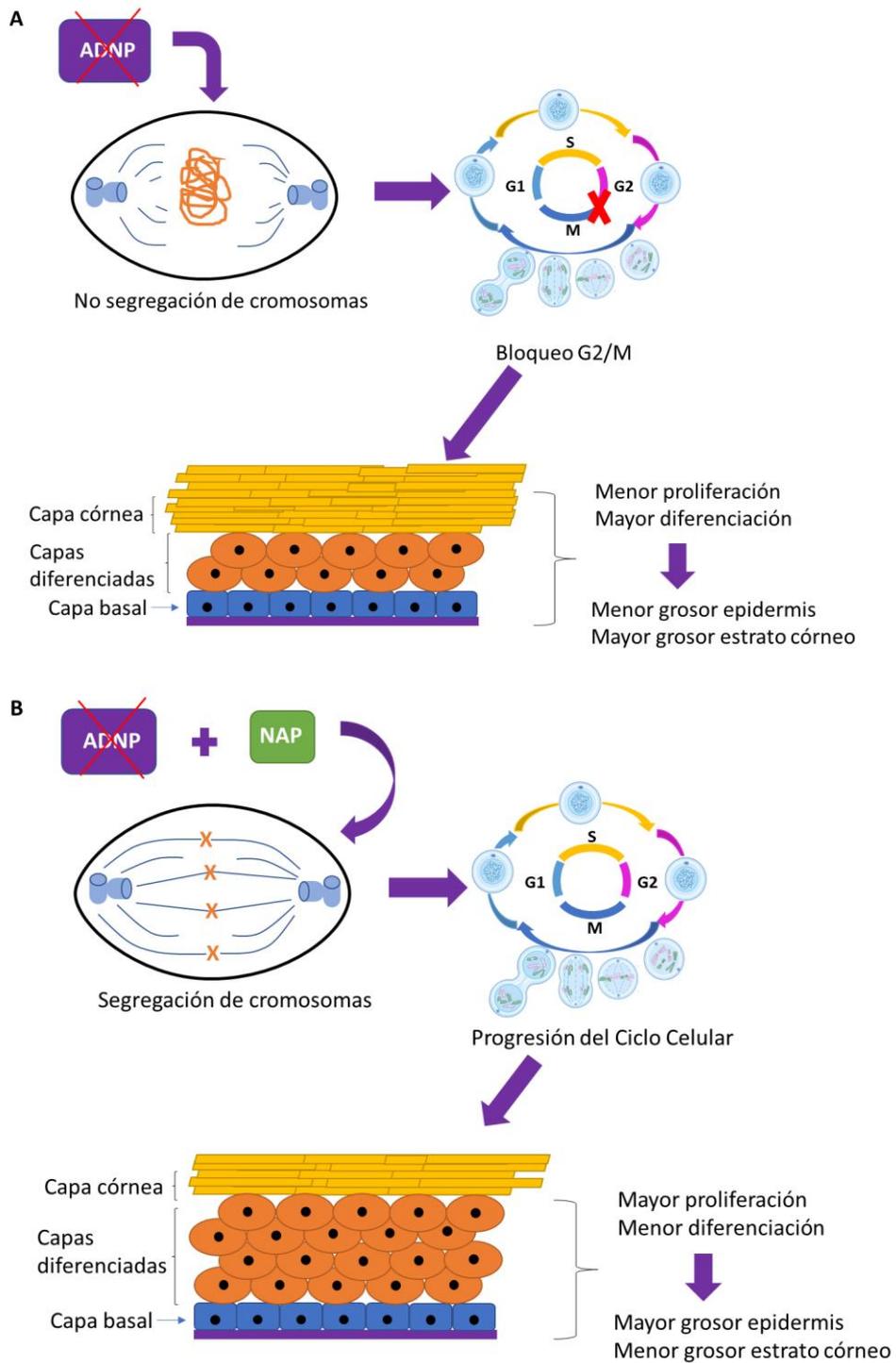


Figura D.1.- A) Posible mecanismo por el que la mutación en el gen *ADNP* podría conllevar a la menor proliferación y mayor diferenciación en queratinocitos. **B)** Posible mecanismo por el que el tratamiento con el péptido NAP podría conllevar un incremento en la proliferación y una disminución en la diferenciación de queratinocitos.

Recientemente se ha descrito que la erupción prematura de los dientes en niños que poseen una mutación en el gen *ADNP*, podría ayudar de forma sencilla a la diagnosis del Síndrome ADNP (Gozes et al., 2017). En esta Tesis Doctoral, demostramos que la mutación en el gen *ADNP* produce alteraciones en la piel. Esta característica podría utilizarse también como síntoma a la hora de diagnosticar el Síndrome ADNP. El empleo de esta característica como marcador de la enfermedad podría realizarse mediante una simple ecografía, ya que hemos visto y demostrado que mediante esta técnica no invasiva se puede detectar y cuantificar el grosor de la epidermis. A lo largo del año 2018, comenzará un Ensayo Clínico en el hospital Monte Sinaí de Nueva York para el empleo de NAP como tratamiento para los pacientes con Síndrome ADNP. Como hemos visto, el tratamiento con NAP produce un incremento del grosor de la epidermis, el cual puede detectarse. Por tanto, el grosor de la epidermis podría utilizarse también como un potencial marcador en los futuros ensayos clínicos del péptido NAP para el tratamiento del Síndrome ADNP, y así lo estamos proponiendo.

Basándonos en los resultados obtenidos mediante el modelo celular de piel, podemos hipotetizar sobre el efecto de la mutación en *ADNP* sobre el resto del organismo. El principal problema de los pacientes con el Síndrome ADNP son las deficiencias y problemas asociados al sistema nervioso. Aunque aún no hay estudios directos sobre los efectos de la mutación de *ADNP* sobre neuronas, podemos pensar que estas células, cuando presentan una mutación en el gen *ADNP*, presentan también un defecto en la condensación y segregación de los cromosomas. Así, las neuronas también poseerían una menor capacidad proliferativa, y los defectos en la mitosis, podrían incluso conllevar a la apoptosis de estas células. A su vez, y basándonos en la importancia de *ADNP* durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso en ratones (Pinhasov et al., 2003), las mutaciones en *ADNP* también podrían conllevar a alteraciones en la diferenciación neuronal. De esta forma, las neuronas de los pacientes con mutaciones en el gen *ADNP* no habrían seguido un proceso de diferenciación adecuado desde el estadio de progenitores neurales hasta la diferenciación y maduración de los diferentes tipos neuronales, incluso, se podría producir la situación en la que las neuronas no llegaran a alcanzar una diferenciación completa. Estos defectos en las neuronas portadoras de la mutación en el gen *ADNP* podrían deberse a un funcionamiento incorrecto de los microtúbulos.

En el caso de producirse este tipo de alteraciones, y dadas las evidencias del éxito del tratamiento con NAP para corregir los defectos celulares en el modelo de piel, podemos pensar que el tratamiento de los pacientes con Síndrome ADNP con este péptido, también puede suponer una mejora de los defectos celulares a nivel de todo el organismo, incluidos los posibles defectos neuronales. En diversos estudios se ha demostrado que mediante la administración del péptido NAP a cultivos de células neuronales primarias, se promueve la aparición de neuritas (Lagrèze et al., 2005; Pascual & Guerri, 2007; Smith-Swintosky et al., 2005). Las neuritas, crecen mediante la polimerización y despolimerización de la red de microtúbulos que las forman, y esta demostrado que mediante la interacción de NAP con los microtúbulos, NAP lleva a cabo

sus funciones neuroprotectoras, mediante el mantenimiento de la dinámica de los microtúbulos.

5.5.- Desarrollo de un modelo celular basado en la reprogramación para el estudio del Síndrome ADNP

Con el objetivo de estudiar el defecto neuronal causado por la mutación en ADNP, nos propusimos el desarrollo de un modelo de células pluripotentes inducidas (iPSCs). Para esta parte del proyecto, contamos con la experiencia en el establecimiento de este tipo de modelos del Dr. Pedro Real Luna, del Centro de Genómica e Investigación Oncológica (Genyo), en Granada. Así pues, se ha desarrollado un modelo de células portadoras de la mutación en el gen *ADNP* que presenta nuestra paciente. El establecimiento de este modelo elimina la necesidad de nuevas extracciones y toma de muestras para el estudio de las consecuencias de la mutación sobre las células. Además, la ventaja de las células madre pluripotentes inducidas, es que pueden ser diferenciadas hacia diferentes linajes celulares. Esto permite estudiar las consecuencias de la mutación en *ADNP* en diferentes tipos celulares, y, además, estudiar los posibles efectos de dicha mutación a través del proceso de diferenciación. Como hemos mencionado anteriormente, ADNP juega un papel vital durante el desarrollo embrionario, por lo que, mediante la diferenciación de estas células hacia diferentes tipos celulares del sistema nervioso, podríamos estudiar los mecanismos regulados por esta proteína y sus implicaciones durante el desarrollo.

Actualmente se está produciendo una tendencia hacia el empleo de las células madre pluripotentes como modelo de desarrollo embrionario. Las células madre pluripotentes presentan dos características que las convierten en un modelo adecuado para el estudio del desarrollo embrionario humano:

- 1) Poseen el potencial necesario para generar cualquier célula adulta. Además, su cultivo *in vitro* facilita una forma rápida y rentable para analizar la función de los genes durante procesos específicos del desarrollo embrionario.
- 2) Estas células poseen una capacidad de auto-renovación ilimitada, pudiendo obtener suficiente material mediante la amplificación de los cultivos para realizar los análisis necesarios.

Mediante la diferenciación dirigida de las células madre pluripotentes, se puede tener acceso a un gran número de tipos celulares embrionarios y a procesos tempranos del desarrollo.

Pero además de para estudiar el desarrollo embrionario normal, las células madre pluripotentes también pueden ser empleadas para el estudio de los casos en los que se produce un desarrollo embrionario anormal. Cuando se produce la mutación de un determinado gen, como es nuestro caso, mediante la generación de células madre

pluripotentes, se puede estudiar que sucede durante la diferenciación hacia diferentes linajes celulares. Es decir, estas células sirven como modelo para el estudio de la patogénesis de ciertas enfermedades humanas. Las células madre pluripotentes que posean las alteraciones genéticas de los pacientes, pueden proporcionar una fuente ilimitada de cualquier tipo celular que se encuentre afectado en dicha enfermedad.

En línea con el tratamiento con NAP en el modelo celular de piel que hemos llevado a cabo, se encuentra la posibilidad del empleo de modelos celulares basados en células madre pluripotentes como modelos para el estudio de fármacos potenciales que puedan ser empleados en enfermedades, y comprobar la eficacia y toxicidad de estos fármacos antes de su empleo en pacientes (Marchetto, Winner, & Gage, 2010; Robinton & Daley, 2012). La utilización de células madre pluripotentes inducidas ha comenzado a tener una gran importancia por su potencial empleo en la clínica, concretamente, en la medicina regenerativa. El potencial uso de estas células en el tratamiento de enfermedades comenzó en el año 2014, con el primer Ensayo Clínico para la degeneración macular (Kamao et al., 2014; Lu et al., 2009; Song et al., 2015). Además, y como ya hemos mencionado, estas células se obtienen y se desarrollan a partir del propio paciente, lo que evita el riesgo al rechazo por falta de histocompatibilidad. La parte negativa la aporta el hecho de que la aplicación de esta tecnología de forma específica para cada paciente, lo que conllevaría un gran coste económico y tiempos de desarrollo que en ocasiones son incompatibles con las necesidades del paciente. Por ello, se está llevando a cabo la creación de bancos de líneas celulares para este tipo de células. Concretamente, en España ya existe un Banco Nacional de Líneas Celulares formado exclusivamente por células madre pluripotentes inducidas. En este banco de células se recogen todas las líneas generadas que poseen una importancia clínica. En este sentido, hemos depositado las células madre reprogramadas que poseen la mutación en el gen *ADNP*, de forma que cualquier investigador podría solicitar su uso para el estudio del Síndrome *ADNP*.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que las células de la piel portadoras de una mutación en el gen *ADNP* sufren una menor capacidad proliferativa junto con una mayor diferenciación terminal escamosa. Esto conlleva a una epidermis más delgada y a un retraso en la cicatrización de las heridas, junto con un engrosamiento de la capa córnea que puede conllevar lesiones hiperqueratóticas en la piel. En este modelo celular demostramos que mediante el tratamiento con el péptido NAP, se produce un incremento de la capacidad proliferativa de las células. Por tanto, el modelo de piel, gracias al engrosamiento de la epidermis que se produce tras el tratamiento con NAP, es un potencial marcador de cara a futuros Ensayos Clínicos. El modelo de células iPSCs se perfila como un modelo sobre el que poder estudiar mejor el efecto de la mutación en el gen *ADNP* sobre los procesos celulares y sobre la diferenciación, y como el tratamiento con NAP puede corregir o revertir los posibles defectos producidos.

CONCLUSIONES

6.- Conclusiones

- 1.- La secuenciación del exoma de la paciente ha permitido identificar la mutación p.Tyr719* en heterocigosis en el gen *ADNP*, que se asocia con el fenotipo clínico, y establecer el diagnóstico de Síndrome ADNP.
- 2.- La piel de la paciente presenta un menor grosor de la epidermis y un mayor grosor del estrato córneo que se acompaña de lesiones hiperqueratósicas en regiones periarticulares. La información aportada por los padres de la paciente sugiere un defecto en la cicatrización de heridas.
- 3.- Se han establecido cultivos de fibroblastos y queratinocitos a partir de una biopsia de piel de la paciente.
- 4.- Los queratinocitos y fibroblastos portadores del gen mutado presentan una menor capacidad proliferativa. En los queratinocitos se observa también una mayor diferenciación.
- 5.- Los marcadores de ciclo celular sugieren una parada premitótica del ciclo celular en G2/M.
- 6.- El tratamiento con el péptido NAP mejora ligeramente la capacidad proliferativa de queratinocitos y fibroblastos mutados, y reduce de forma significativa la diferenciación de los queratinocitos de la paciente.
- 7.- En un modelo de ratón hemicigoto para el gen *Adnp*, se observan defectos en las células de la piel de estos ratones similares a los encontrados en la paciente. Entre ellos, una menor proliferación de fibroblastos *in vitro*, una mayor diferenciación en las capas suprabasales, enriquecidas en queratinocitos, y un menor grosor de la epidermis.
- 8.- El tratamiento del ratón hemicigoto y de cultivos de fibroblastos de la piel de estos ratones con el péptido NAP atenúa los defectos producidos por la mutación de *Adnp*.
- 9.- El grosor de la epidermis medido mediante ecografía podría ser un marcador no invasivo de respuesta al tratamiento con NAP en pacientes con Síndrome ADNP.
- 10.- Se ha iniciado también la generación de otro modelo celular del Síndrome ADNP con células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

Conclusiones

Bibliografía

- Alberts B, J. A., Lewis J, Raff M, Roberts K, W. P. (2007). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
- Alcalay, R. N., Giladi, E., Pick, C. G., & Gozes, I. (2004). Intranasal administration of NAP, a neuroprotective peptide, decreases anxiety-like behavior in aging mice in the elevated plus maze. *Neuroscience Letters*, 361(1–3), 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.005>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Arlington. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. . B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23(october), 185–188. <https://doi.org/10.1038/13810>
- Arregui, C., Busciglio, J., Caceres, A., & Barra, H. S. (1991). Tyrosinated and detyrosinated microtubules in axonal processes of cerebellar macroneurons grown in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 28(2), 171–181. <https://doi.org/10.1002/jnr.490280204>
- Auburger, G., Klinkenberg, M., Drost, J., Marcus, K., Morales-Gordo, B., Kunz, W. S., ... Jendrach, M. (2012). Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, 46(1), 20–27. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8245-1>
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development on SOX2 function. *Genes Dev.*, 17, 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Baas, P. W., & Ahmad, F. J. (2013). Beyond taxol: Microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system. *Brain*, 136(10), 2937–2951. <https://doi.org/10.1093/brain/awt153>
- Bassan, M., Zamostiano, R., Davidson, a, Pinhasov, a, Giladi, E., Perl, O., ... Gozes, I. (1999). Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *Journal of Neurochemistry*, 72, 1283–1293. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0721283.x>
- Beni-Adani, L., Gozes, I., Cohen, Y., Assaf, Y., Steingart, R. A., Brenneman, D. E., ... Shohami, E. (2001). A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(1), 57–63. <https://doi.org/VL - 296>
- Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S. P., Zamostiano, R., Gozes, I., ... McKay, R. D. G. (2000). A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 8012–8020. <https://doi.org/20/21/8012> [pii]
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., ... Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>

- Bradke, F., & Dotti, C. G. (1997). Neuronal polarity: Vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*, *19*(6), 1175–1186. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80410-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80410-9)
- Bradke, F., Dotti, C. G., Bradke, F., & Dotti, C. G. (2016). The Role of Local Actin Instability in Axon Formation Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2896648> Linked references are available on JSTOR for this article : The Role of Local Actin I, *283*(5409), 1931–1934.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., & Jaenisch, R. (2008). Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell*, *2*(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.004>
- Cammas, F., Herzog, M., Lerouge, T., Chambon, P., & Losson, R. (2004). Association of the transcriptional corepressor TIF1b with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes & Development*, *18*(18), 2147–2160. <https://doi.org/10.1101/gad.302904.TIF1>
- Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J.-L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P., & Losson, R. (2002). Cell differentiation induces TIF1 β association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *Journal of Cell Science*, *115*(17), 3439–3448. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036713129&partnerID=40&md5=e6626bfd5f65ff1e10a20e9fd6cf2fdc>
- Carter, M. T., & Scherer, S. W. (2013). Autism spectrum disorder in the genetics clinic: A review. *Clinical Genetics*, *83*(5), 399–407. <https://doi.org/10.1111/cge.12101>
- Castelli-Gair Hombría, J., & Lovegrove, B. (2003). Beyond homeosis - HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation*, *71*(8), 461–476. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.7108004.x>
- Cervato, S., Mariniello, B., Lazzarotto, F., Morlin, L., Zanchetta, R., Radetti, G., ... Betterle, C. (2009). Evaluation of the autoimmune regulator (AIRE) gene mutations in a cohort of Italian patients with autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal- dystrophy (APECED) and in their relatives. *Clinical Endocrinology*, *70*(3), 421–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03318.x>
- Chakraborty, A., Prasanth, K. V., & Prasanth, S. G. (2014). Dynamic phosphorylation of HP1 α regulates mitotic progression in human cells. *Nature Communications*, *5*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms4445>
- Cheng, F., Shen, Y., Mohanasundaram, P., Lindström, M., Ivaska, J., Ny, T., & Eriksson, J. E. (2016). Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(30), E4320–E4327. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519197113>
- Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S., & Laskey, R. a. (2000). Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a

- cyclin A-cdk2 dependent process. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 1, 1929–1938. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806104>
- CRISTIANO SIMONE. (2006). SWI/SNF: The Crossroads Where Extracellular Signaling Pathways Meet Chromatin. *Journal of Cellular Physiology*, 207, 309–314. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- De Lucia, F., Ni, J. Q., Vaillant, C., & Sun, F. L. (2005). HP1 modulates the transcription of cell-cycle regulators in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 33(9), 2852–2858. <https://doi.org/10.1093/nar/gki584>
- Dickey, J. S., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Baird, B. J., Sedelnikova, O. A., & Bonner, W. M. (2009). H2AX: Functional roles and potential applications. *Chromosoma*, 118(6), 683–692. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0234-4>
- Divinski, I., Holtser-Cochav, M., Vulih-Schultzman, I., Steingart, R. A., & Gozes, I. (2006). Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 973–984. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03936.x>
- Divinski, I., Mittelman, L., & Gozes, I. (2004). A femtomolar acting octapeptide interacts with tubulin and protects astrocytes against zinc intoxication. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28531–28538. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403197200>
- Eissenberg, J. C., & Elgin, S. C. (2000). The HP1 protein family: Getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10(2), 204–210. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00058-7)
- Erturk, A., Hellal, F., Enes, J., & Bradke, F. (2007). Disorganized Microtubules Underlie the Formation of Retraction Bulbs and the Failure of Axonal Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 27(34), 9169–9180. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0612-07.2007>
- Ferreira, A., & Caceres, A. (1992). Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 32(4), 516–529. <https://doi.org/10.1002/jnr.490320407>
- Freije, A., Molinuevo, R., Ceballos, L., Cagigas, M., Alonso-Lecue, P., Rodriguez, R., ... Gandarillas, A. (2014). Inactivation of p53 in Human Keratinocytes Leads to Squamous Differentiation and Shedding via Replication Stress and Mitotic Slippage. *Cell Reports*, 9(4), 1349–1360. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.012>
- Freije, a, Ceballos, L., Coisy, M., Barnes, L., Rosa, M., De Diego, E., ... Gandarillas, a. (2012). Cyclin E drives human keratinocyte growth into differentiation. *Oncogene*, 31(50), 5180–5192. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.22>
- Fuchs, E., & Chen, T. (2012). A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Reports*, 14(1), 39–48. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.197>
- Fuchs, E., & Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19(4), 1033–1042. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90094-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90094-X)

Bibliografia

- Furman, S., Hill, J. M., Vulih, I., Zaltzman, R., Hauser, J. M., Brenneman, D. E., & Gozes, I. (2005). Sexual dimorphism of activity-dependent neuroprotective protein in the mouse arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, *373*(1), 73–78.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.077>
- Furman, S., Steingart, R. A., Mandel, S., Hauser, J. M., Brenneman, D. E., & Gozes, I. (2004). Subcellular localization and secretion of activity-dependent neuroprotective protein in astrocytes. *Neuron Glia Biol*, *1*(3), 193–199.
<https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.003.Novel>
- Gandarillas, A. (2012). The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint. *Cell Cycle*, *11*(24), 4507–4516.
<https://doi.org/10.4161/cc.22529>
- Gandarillas, A., & Freije, A. (2014). Cycling up the epidermis: Reconciling 100 years of debate. *Experimental Dermatology*, *23*(2), 87–91.
<https://doi.org/10.1111/exd.12287>
- Gandarillas, a, Davies, D., & Blanchard, J. M. (2000). Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene*, *19*(29), 3278–3289.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203630>
- Gard, D. L., & Kirschner, M. W. (1985). A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *The Journal of Cell Biology*, *100*(3), 764–774.
<https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.764>
- Geraldo, S., Khanzada, U. K., Parsons, M., Chilton, J. K., & Gordon-Weeks, P. R. (2008). Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nature Cell Biology*, *10*(10), 1181–1189. <https://doi.org/10.1038/ncb1778>
- Gozes, I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein: From gene to drug candidate. *Pharmacology and Therapeutics*, *114*(2), 146–154.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.004>
- Gozes, I., Bachar, M., Bardea, A., Davidson, A., Rubinraut, S., Fridkin, M., & Giladi, E. (1997). Protection against developmental retardation in apolipoprotein E-deficient mice by a fatty neuropeptide: Implications for early treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Neurobiology*, *33*(3), 329–342.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199709\)33:3<329::AID-NEU10>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199709)33:3<329::AID-NEU10>3.0.CO;2-A)
- Gozes, I., & Barnstable, C. J. (1982). Monoclonal antibodies that recognize discrete forms of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(8), 2579–2583. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.8.2579>
- Gozes, I., Giladi, E., Pinhasov, a, Bardea, a, & Brenneman, D. E. (2000). Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *293*(3), 1091–1098. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869414>

- Gozes, I., Glowa, J., Brenneman, D. E., McCune, S. K., Lee, E., & Westphal, H. (1993). Learning and sexual deficiencies in transgenic mice carrying a chimeric vasoactive intestinal peptide gene. *Journal of Molecular Neuroscience*, 4(3), 185–193. <https://doi.org/10.1007/BF02782501>
- Gozes, I., & Ivashko-Pachima, Y. (2015). ADNP: In search for molecular mechanisms and innovative therapeutic strategies for frontotemporal degeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00205>
- Gozes, I., Morimoto, B. H., Tiong, J., Fox, A., Sutherland, K., Dangoor, D., ... Thal, L. (2005). NAP: Research and Development of a Peptide Derived from Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) PHARMACOLOGY OF NAP Background. *CNS Drug Reviews*, 11(4), 353–368. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2005.tb00053.x>
- Gozes, I., & Spivak-Pohis, I. (2006). Neurotrophic Effects of the Peptide NAP: A Novel Neuroprotective Drug Candidate. *Current Alzheimer Research*, 3(3), 197–199. <https://doi.org/10.2174/156720506777632790>
- Gozes, I., Van Dijck, A., Hachohen-Kleiman, G., Grigg, I., Karmon, G., Giladi, E., ... Bedrosian-Sermone, S. (2017). Premature primary tooth eruption in cognitive/motor-delayed ADNP-mutated children. *Translational Psychiatry*, 7(2), e1043. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.27>
- Gozes, I., Zaltzman, R., Hauser, J., Brenneman, D., Shohami, E., & Hill, J. (2005). The Expression of Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) is Regulated by Brain Damage and Treatment of Mice with the ADNP Derived Peptide, NAP, Reduces the Severity of Traumatic Head Injury. *Current Alzheimer Research*, 2(2), 149–153. <https://doi.org/10.2174/1567205053585873>
- Gozes, I., Zamostiano, R., Pinhasov, A., Bassan, M., & Giladi, E. (2000). A Novel VIP Responsive Gene, 115–118.
- Gozes I, Patterson MC, Van Dijck A, Kooy RF, Peeden JN, Eichenberger JA, Z.-D. A. and B.-S. S. (2017). The Eight and a Half Year Journey of Undiagnosed AD: Gene Sequencing and Funding of Advanced Genetic Testing Has Led to Hope and New Beginnings. *Front. Endocrinol.*, 8(107).
- Greene, N. D. E., Leung, K. Y., Wait, R., Begum, S., Dunn, M. J., & Copp, A. J. (2002). Differential protein expression at the stage of neural tube closure in the mouse embryo. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41645–41651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203607200>
- Gressens, P., Hill, J. M., Gozes, I., Fridkin, M., & Brenneman, D. (1993). Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature*, 362, 155–158.
- Gressens, P., Hill, J. M., Painsaveine, B., Gozes, I., Fridkin, M., & Brenneman, D. E. (1994). Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *Journal of Clinical*

- Investigation*, 94(5), 2020–2027. <https://doi.org/10.1172/JCI117555>
- Gu, C., Zhou, W., Puthenveedu, M. A., Xu, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2006). The Microtubule Plus-End Tracking Protein EB1 Is Required for Kv1 Voltage-Gated K⁺ Channel Axonal Targeting. *Neuron*, 52(5), 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.022>
- Harper, J. W., Burton, J. L., & Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex : it ' s not just for mitosis any more. *Genes & Development*, 2179–2206. <https://doi.org/10.1101/gad.1013102.more>
- Hayakawa, T. (2003). Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *Journal of Cell Science*, 116(16), 3327–3338. <https://doi.org/10.1242/jcs.00635>
- Helsmoortel, C., Vandeweyer, G., Ordoukhanian, P., Van Nieuwerburgh, F., Van der Aa, N., & Kooy, R. F. (2015). Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family-based whole-exome sequencing. *Clinical Genetics*, 88(2), 140–148. <https://doi.org/10.1111/cge.12470>
- Helsmoortel, C., Vulto-van Silfhout, A. T., Coe, B. P., Vandeweyer, G., Rooms, L., van den Ende, J., ... Van der Aa, N. (2014). A SWI/SNF-related autism syndrome caused by de novo mutations in ADNP. *Nature Genetics*, 46(4), 380–384. <https://doi.org/10.1038/ng.2899>
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., ... Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348–360. <https://doi.org/10.1007/s004120050256>
- Ho, L., & Crabtree, G. R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature*, 463(7280), 474–484. <https://doi.org/10.1038/nature08911>
- Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H., ... Steinmetz, M. O. (2009). An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell*, 138(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.065>
- I, Gozes, D. I. (2004). The femtomolar-acting NAP interacts with microtubules: Novel aspects of astrocyte protection. *J Alzheimers Dis*, 6(6 Suppl), S37–41.
- Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., ... Hoogenraad, C. C. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 61(1), 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.013>
- Jennetta W. Hammond,*† Chun-Fang Huang, ‡ Stefanie Kaech, & Catherine Jacobson,‡§ Gary Banker, and K. J. V. (2010). Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 21(22), 572–583. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>

- Jones, P. H., & Watt, F. M. (1993). Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73(4), 713–724. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90251-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90251-K)
- Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., ... Takahashi, M. (2014). Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports*, 2(2), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.12.007>
- Katsetos, C. D., Herman, M. M., & Mörk, S. J. (2003). Class III beta-tubulin in human development and cancer. *TL - 55. Cell Motility and the Cytoskeleton*, 55 VN-r(2), 77–96. <https://doi.org/10.1002/cm.10116>
- Kervestin, S., & Jacobson, A. (2012). NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(11), 700–712. <https://doi.org/10.1038/nrm3454>
- Komarova Y., Lansbergen G., Galjart N, Grosveld F., Borisy GG., A. A. (2005). EB1 and EB3 Control CLIP Dissociation from the Ends of Growing Microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 5334–5345. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>
- Krumm, N., O’Roak, B. J., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2014). A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends in Neurosciences*, 37(2), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.11.005>
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., & Cá Ceres, A. (2001). Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation. *The Journal of Neuroscience*, 21(7), :2361–2372. <https://doi.org/21/7/2361> [pii]
- Lagrèze, W. A., Pielen, A., Steingart, R., Schlunck, G., Hofmann, H. D., Gozes, I., & Kirsch, M. (2005). The peptides ADNF-9 and NAP increase survival and neurite outgrowth of rat retinal ganglion cells in vitro. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(3), 933–938. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0766>
- Lechner, M. S., Schultz, D. C., Negorev, D., Maul, G. G., & Rauscher, F. J. (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), 929–937. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.016>
- Leker, R. R., Teichner, A., Grigoriadis, N., Ovadia, H., Brenneman, D. E., Fridkin, M., ... Gozes, I. (2002). NAP, a femtomolar-acting peptide, protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*, 33(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000014207.05597.D7>
- Lessard, J., Wu, J. I., Ranish, J. A., Wan, M., Winslow, M. M., Staahl, B. T., ... Crabtree, G. R. (2007). An Essential Switch in Subunit Composition of a Chromatin Remodeling Complex during Neural Development. *Neuron*, 55(2), 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.019>
- Li, Y., Polak, U., Clark, A. D., Bhalla, A. D., Chen, Y.-Y., Li, J., ... Napierala, M. (2016). Establishment and Maintenance of Primary Fibroblast Repositories for Rare

- Diseases—Friedreich’s Ataxia Example. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 324–329. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0117>
- Lindh, E., Lind, S. M., Lindmark, E., Hässler, S., Perheentupa, J., Peltonen, L., ... Karlsson, M. C. I. (2008). AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), 18466–18471. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808205105>
- Lopez-Onieva, L., Lamolda, M., Montes, R., Lozano, M. L., Vicente, V., Rivera, J., ... Real, P. J. (2017). Induced pluripotent stem cells derived from Bernard-Soulier Syndrome patient’s peripheral blood cells with a p.Phe55Ser mutation in the GPIX gene. *Stem Cell Research*, 20, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.02.001>
- Lopez-Onieva, L., Machuca, C., Lamolda, M., Montes, R., Lozano, M. L., Vicente, V., ... Real, P. J. (2016). Generation of a human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a Bernard-Soulier syndrome patient with the mutation p.Asn45Ser in the GPIX gene. *Stem Cell Research*, 17(3), 603–606. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.11.012>
- Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., ... Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells*, 27(9), 2126–2135. <https://doi.org/10.1002/stem.149>
- Ludueña, R. F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International Review of Cytology*, 178, 207–275. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62138-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62138-5)
- Lundberg, A. ., & Weinberg, R. . (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer*, 35(14), 1886–1894. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00292-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00292-0)
- Malishkevich, A., Amram, N., Hacoheh-Kleiman, G., Magen, I., Giladi, E., & Gozes, I. (2015). Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) exhibits striking sexual dichotomy impacting on autistic and Alzheimer’s pathologies. *Translational Psychiatry*, 5(2), e501. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.138>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Mandel, S., & Gozes, I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein constitutes a novel element in the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34448–34456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704756200>
- Mandel, S., Rechavi, G., & Gozes, I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) differentially interacts with chromatin to regulate genes essential for embryogenesis. *Developmental Biology*, 303(2), 814–824. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.11.039>
- Marchetto, M. C. N., Winner, B., & Gage, F. H. (2010). Pluripotent stem cells in

- neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Human Molecular Genetics*, 19(R1), 71–76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq159>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Mendelsohn, N. J., & Schaefer, G. B. (2008). Genetic Evaluation of Autism. *Seminars in Pediatric Neurology*, 15(1), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2008.01.005>
- Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P. J., Brown, D. T., & Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Developmental Cell*, 10(1), 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.017>
- Michaelis, M. L., Ansar, S., Chen, Y., Reiff, E. R., Seyb, K. I., Himes, R. H., ... Georg, G. I. (2005). {beta}-Amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents. *J Pharmacol Exp Ther*, 312(2), 659–668. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.074450>
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., ... Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 454(7200), 49–55. <https://doi.org/10.1038/nature07056>
- Min Li, Csaba David, Toshiteru Kikuta, A. S.-V., & Arimura, and A. (2005). Signaling Cascades Involved in Neuroprotection by Subpicomolar Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide 38. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 27(1), 13–22. <https://doi.org/10.1385/JMN:27:01:91>
- Molinuevo, R., Freije, A., de Pedro, I., Stoll, S. W., Elder, J. T., & Gandarillas, A. (2016). FOXM1 allows human keratinocytes to bypass the oncogene-induced differentiation checkpoint in response to gain of MYC or loss of p53. *Oncogene*, (October 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.262>
- Müller, R. (1995). Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends in Genetics : TIG*, 11(5), 173–178. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89039-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89039-3)
- Murray, A. W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell*, 116(2), 221–234. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8)
- Nakagawa, H., Koyama, K., Murata, Y., Morito, M., Akiyama, T., & Nakamura, Y. (2000). EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene*, 19(2), 210–216. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203308>
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., ... Nakanishia, M. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: A unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4760–4771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.183780>
- O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., ... Eichler, E. E.

- (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, *485*(7397), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature10989>
- Offen, D., Sherki, Y., Melamed, E., Fridkin, M., Brenneman, D. E., & Gozes, I. (2000). Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: Relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Research*, *854*(1–2), 257–262. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02375-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02375-6)
- Okada, M., & Yoneda, Y. (2011). The timing of retroviral silencing correlates with the quality of induced pluripotent stem cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1810*(2), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.10.004>
- Oz, S., Ivashko-Pachima, Y., & Gozes, I. (2012). The ADNP Derived Peptide, NAP Modulates the Tubulin Pool: Implication for Neurotrophic and Neuroprotective Activities. *PLoS ONE*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051458>
- Oz, S., Kapitansky, O., Ivashco-Pachima, Y., Malishkevich, a, Giladi, E., Skalka, N., ... Gozes, I. (2014). The NAP motif of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) regulates dendritic spines through microtubule end binding proteins. *Molecular Psychiatry*, *19*(10), 1115–1124. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.97>
- Pascual, M., & Guerri, C. (2007). The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal-regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *Journal of Neurochemistry*, *103*(2), 557–568. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04761.x>
- Pinhasov, A., Mandel, S., Torchinsky, A., Giladi, E., Pittel, Z., Goldsweig, A. M., ... Gozes, I. (2003). Activity-dependent neuroprotective protein: A novel gene essential for brain formation. *Developmental Brain Research*, *144*(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(03\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(03)00162-7)
- Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., ... Scherer, S. W. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*, *94*(5), 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>
- Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., ... Betancur, C. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, *466*(7304), 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature09146>
- Quintana, F. J., Zaltzman, R., Fernandez-Montesinos, R., Herrera, J. L., Gozes, I., Cohen, I. R., & Pozo, D. (2006). NAP, a peptide derived from the activity-dependent neuroprotective protein, modulates macrophage function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1070*, 500–506. <https://doi.org/10.1196/annals.1317.069>
- Ramos-Mejía, V., Montes, R., Bueno, C., Ayllón, V., Real, P. J., Rodríguez, R., & Menendez, P. (2012). Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+

- progenitors. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035824>
- Rheinwald, J. (1989). *Methods for clonal growth and serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes and mesothelial cells*. (Oxford: IRL Press, Ed.), In: Baserg R, ed. *Cell growth and division*.
- Roak, B. J. O., Vives, L., Fu, W., Egertson, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., ... Shendure, J. (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in Autism Spectrum Disorders, 23(DECEMBER), 1619–1623.
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305. <https://doi.org/10.1038/nature10761>
- Ronan, J. L., Wu, W., & Crabtree, G. R. (2013). From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nature Reviews Genetics*, 14(5), 347–359. <https://doi.org/10.1038/nrg3413>
- Rooms, L., & Kooy, R. F. (2011). Advances in understanding fragile X syndrome and related disorders. *Current Opinion in Pediatrics*, 23, 601–606. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32834c7f1a>
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H. K., Beyer, T. A., Datti, A., ... Wrana, J. L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-Driven mesenchymal-to-Epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 7(1), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.015>
- Sanders, S. J., Ercan-Sencicek, A. G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M. T., Moreno-De-Luca, D., ... State, M. W. (2011). Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron*, 70(5), 863–885. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.002>
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The Familial Risk of Autism. *Jama*, 311(17), 1770. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>
- Sherr, C. J., Roberts, J. M., Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, (Morgan 1997), 2699–2711. <https://doi.org/10.1101/gad.1256504>
- Smith-Swintosky, V. L., Gozes, I., Brenneman, D. E., D'Andrea, M. R., & Plata-Salaman, C. R. (2005). Activity-dependent neurotrophic factor-9 and NAP promote neurite outgrowth in rat hippocampal and cortical cultures. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 25(3), 225–238. <https://doi.org/10.1385/JMN:25:3:225>
- Song, W. K., Park, K.-M., Kim, H.-J., Lee, J. H., Choi, J., Chong, S. Y., ... Lanza, R. (2015). Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Reports*, 4(5), 860–872. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.005>
- Spong, C. Y., Abebe, D. T., Gozes, I., Brenneman, D. E., & Hill, J. M. (2001). Prevention

- of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(2), 774–779. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11303069%5Cnhttp://jpet.aspetjournals.org/content/297/2/774.full.pdf
- Stadtfeld, M., Hochedlinger, K., Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications. *Genes Dev.*, 24, 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., & Hochedlinger, K. (2008). Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse. *Cell Stem Cell*, 2(3), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.001>
- Steingart, R. A., & Gozes, I. (2006). Recombinant activity-dependent neuroprotective protein protects cells against oxidative stress. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 252(1–2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.029>
- Steingart, R. A., Solomon, B., Brenneman, D. E., Fridkin, M., & Gozes, I. (2000). VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect PC12 cells against oxidative stress. *J Mol Neurosci*, 15(3), 137–145. <https://doi.org/10.1385/JMN:15:3:137>
- Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C. C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C. I., ... Galjart, N. (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(7), 2655–2664. <https://doi.org/23/7/2655> [pii]
- Sun, T. T., & Green, H. (1976). Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: Formation of the cornified envelope. *Cell*, 9(4 PART 1), 511–521. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90033-7)
- Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H. R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P. R., ... Laue, E. D. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *The EMBO Journal*, 23(3), 489–499. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600088>
- Thomson, J. A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (2009). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Advancement Of Science*, 282(5391), 1145–1147.
- Tuszynski, M. H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D. P., Sang U, H., Bakay, R., ... Conner, J. (2005). A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature Medicine*, 11(5), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nm1239>
- U.S. Department of Health and Human Services. (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 63(2), 1–21. <https://doi.org/24670961>

- Van Dijck, A., Vulto-van Silfhout, A. T., Cappuyns, E., van der Werf, I. M., Mancini, G. M., Tzschach, A., ... Kooy, R. F. (2018). Clinical presentation of a complex neurodevelopmental disorder caused by mutations in ADNP. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.1173>
- Van Mulder, T. J. S., de Koeijer, M., Theeten, H., Willems, D., Van Damme, P., Demolder, M., ... Vankerckhoven, V. (2017). High frequency ultrasound to assess skin thickness in healthy adults. *Vaccine*, *35*(14), 1810–1815. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.039>
- Veltman, J. A., & Brunner, H. G. (2012). De novo mutations in human genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, *13*(8), 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrg3241>
- Verhey, K. J., & Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle*, *6*(17), 2152–2160. <https://doi.org/10.4161/cc.6.17.4633>
- Visochek, L. (2005). PolyADP-Ribosylation Is Involved in Neurotrophic Activity. *Journal of Neuroscience*, *25*(32), 7420–7428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0333-05.2005>
- Vulih-Shultzman, I., Pinhasov, A., Mandel, S., Grigoriadis, N., Touloumi, O., Pittel, Z., & Gozes, I. (2007). Activity-Dependent Neuroprotective Protein Snippet NAP Reduces Tau Hyperphosphorylation and Enhances Learning in a Novel Transgenic Mouse Model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *323*(2), 438–449. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129551>
- Walther, C., & Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, *113*, 1435–1449. <https://doi.org/1687460>
- Warnatz, H.-J., Querfurth, R., Guerasimova, A., Cheng, X., Haas, S. a, Hufton, A. L., ... Yaspo, M.-L. (2010). Functional analysis and identification of cis-regulatory elements of human chromosome 21 gene promoters. *Nucleic Acids Research*, *38*(18), 6112–6123. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq402>
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y., Li, H., Daley, Q., ... Thorsten, M. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA Luigi. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>. Highly
- Watt, F. M. (2014). Mammalian skin cell biology: At the interface between laboratory and clinic. *Science*, *346*(6212), 937–940. <https://doi.org/10.1126/science.1253734>
- Watt, F. M., Celso, C. Lo, & Silva-Vargas, V. (2006). Epidermal stem cells: an update. *Current Opinion in Genetics & Development*, *16*(5), 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.08.006>
- Watt, F. M., & Green, H. (1981). Involucrin Synthesis Is Correlated with Cell Size in Human Epidermal Cultures Preparation of Cell Extracts Immunoprecipitation of Involucrin. *The Journal of Cell Biology*, *90*(September), 738–742.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, *81*(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)

- Wilkemeyer, M. F., Chen, S., Menkari, C. E., Brenneman, D. E., Sulik, K. K., & Charness, M. E. (2003). Differential effects of ethanol antagonism and neuroprotection in peptide fragment NAPVSIPQ prevention of ethanol-induced developmental toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8543–8548. <https://doi.org/10.1073/pnas.1331636100>
- Wilkemeyer, M. F., Menkari, C. E., Spong, C. Y., & Charness, M. E. (2002). Peptide antagonists of ethanol inhibition of I1-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *303*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.036277>
- Williams, L., Zhao, J., Morozova, N., Li, Y., Avivi, Y., & Grafi, G. (2003). Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. *Developmental Dynamics*, *228*(1), 113–120. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10348>
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., ... Nagy, A. (2009). PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, *458*(7239), 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07863>
- Wu, J. Y., Henins, K. a, Gressens, P., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D. E., & Hill, J. M. (1997). Neurobehavioral development of neonatal mice following blockade of VIP during the early embryonic period. *Peptides*, *18*(8), 1131–1137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396053>
- Zaltzman, R., Alexandrovich, A., Beni, S. M., Trembovler, V., Shohami, E., & Gozes, I. (2004). Brain injury-dependent expression of activity-dependent neuroprotective protein. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, *24*(2), 181–187. <https://doi.org/10.1385/JMN:24:2:181>
- Zaltzman, R., Alexandrovich, A., Trembovler, V., Shohami, E., & Gozes, I. (2005). The influence of the peptide NAP on Mac-1-deficient mice following closed head injury. *Peptides*, *26*(8), 1520–1527. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.014>
- Zamostiano, R., Pinhasov, A., Gelber, E., Steingart, R. A., Seroussi, E., Giladi, E., ... Gozes, I. (2001). Cloning and characterization of the human activity-dependent neuroprotective protein. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(1), 708–714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007416200>
- Zanet, J., Freije, A., Ruiz, M., Coulon, V., Sanz, J. R., Chiesa, J., & Gandarillas, A. (2010). A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication. *PLoS ONE*, *5*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015701>
- Zemlyak, I., Furman, S., Brenneman, D. E., & Gozes, I. (2000). A Novel peptide prevents death in enriched neuronal cultures. *Regulatory Peptides*, *96*(1–2), 39–43. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(00\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(00)00198-1)
- Zusev, M., & Gozes, I. (2004). Differential regulation of activity-dependent

neuroprotective protein in rat astrocytes by VIP and PACAP. *Regulatory Peptides*, 123(1–3 SPEC. ISS.), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.05.021>