



1. DATOS BÁSICOS DEL TFG:

Título: Desarrollo de Vectores Lentivirales para la Expresión Estable y Caracterización Funcional de Variantes Genéticas en Hipofosfatasia

Descripción general (resumen y metodología):

La Hipofosfatasia (HPP) es una enfermedad genética rara y, en algunos casos letal, caracterizada principalmente por defectos en la mineralización ósea y dental¹. La prevalencia de esta enfermedad es difícil de estimar debido al desconocimiento de este trastorno, a la alta tasa de infradiagnóstico de la enfermedad, y al solapamiento de la sintomatología con otros trastornos más frecuentes. En España se ha estimado que la prevalencia de las formas moderadas de HPP podría ser de 1/3.1002. Esta enfermedad está causada por una o más mutaciones en el gen ALPL que codifica la proteína fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP)³ cuya función es la hidrólisis de los enlaces monoéster de diversas moléculas fosforiladas para producir fosfato inorgánico (Pi). Entre los sustratos de TNSALP podemos destacar el pirofosfato inorgánico (PPi) cuya hidrólisis da lugar a Pi, (necesario para la producción de cristales de hidroxiapatita⁴ implicados en la formación ósea). El piridoxal-5-fosfato (PLP), también conocido como vitamina B6, es otro sustrato importante de TNSALP y un precursor de algunos neurotransmisores¹ por lo que algunos pacientes afectados presentan además trastornos a nivel neurológico. Entre otros sustratos de TNSALP se encuentran algunos precursores inflamatorios como lipopolisacáridos bacterianos (LPS)⁵, adenosin trifosfato (ATP)⁶ y osteopontina fosforilada⁷, lo que sugiere una potencial función de TNSALP a nivel inflamatorio, aunque este aspecto no ha sido estudiado hasta la fecha en humanos. Para estudiar el papel de TNSALP a nivel inflamatorio, se pretende llevar a cabo este proyecto, con objeto de realizar la caracterización funcional de nuevas variantes identificadas en el gen ALPL en el contexto de la inflamación. Para ello se construirán partículas lentivirales para la expresión de las variantes genéticas a estudiar en distintas líneas celulares inmunitarias. Tras la expresión de las variantes, se realizarán distintos ensayos de actividad que se detallan en la metodología. Con esta aproximación, pretendemos caracterizar la proteína TNSALP en el contexto inflamatorio/inmunitario, ya que actualmente no existen evidencias científicas en esta línea. Así, este proyecto pretende avanzar en el conocimiento a nivel molecular de la relación entre actividad fosfatasa alcalina y desarrollo de alteraciones autoinmunes y/o inflamatorias

Metodología

1. Estudio del papel regulador de TNSALP en respuesta a estímulos proinflamatorios en Linfocitos, Monocitos y Neutrófilos mediante ensayos in vitro por generación de partículas lentivirales.

1.1. Construcción de plásmidos lentivirales con las variantes del gen ALPL identificadas en la cohorte de pacientes HPP: Para conocer los mecanismos moleculares del papel de TNSALP en inflamación, se construirán vectores virales de segunda generación usando el plásmido pLVX con un gen de resistencia a higromicina conteniendo las diferentes mutaciones en el gen ALPL identificadas en la cohorte de pacientes con HPP, así como la secuencia canónica del gen (WT). Se diseñarán los correspondientes oligonucleótidos mediante el software Clonemanager, y se realizarán las correspondientes amplificaciones de los insertos mediante PCR usando como DNA molde las construcciones del grupo en pCDNA 3.1 conteniendo las distintas variantes. Las digestiones y ligaciones se llevarán a cabo por las enzimas de restricción NheI y BamHI (Fast Digest de Thermofisher) y ligasa T4 (Thermo Fisher) respectivamente.

1.2. Producción de partículas lentivirales y determinación de la titulación para la transducción

de distintas líneas celulares: La sobreexpresión de las proteínas de interés se llevará a cabo mediante transducción celular a través de lentivirus de segunda generación. Para generar los lentivirus, se realizará una transfección química utilizando lipofectamina 3000 en diferentes líneas celulares (células derivadoras de macrófagos (U937), linfocitos (JurKat) y células derivadoras de neutrófilos (HL60)), con tres plásmidos diferentes: pLVX-IRES-HYG, que contiene insertada en el sitio multiclonig la secuencia del gen de interés y la resistencia a higromicina; psPAX2, que proporciona el empaquetamiento lentiviral; y, pVSV-G que expresa la glicoproteína envuelta del virus de la estomatitis vesicular. Tras la incubación del cultivo, se recogerán los virus de segunda generación y se utilizarán para la transducción de las líneas celulares seleccionadas. Las células transducidas se seleccionarán mediante higromicina y la sobreexpresión de genes/proteínas de interés se comprobará mediante RT-qPCR y Western Blot respectivamente. Las células U937 se diferenciarán a macrófagos proinflamatorios (M1) mediante la incubación con Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) durante 36-48h mientras que las células HL60 se diferenciarán en neutrófilos mediante la administración de dimetil sulfoxido (DMSO) durante 7 días y serán debidamente fenotipados mediante citometría de flujo.

1.3. Ensayos de actividad de ALP en las distintas líneas celulares transducidas y ensayos in vitro de inflamación: Se medirá la actividad de fosfatasa alcalina en todas las líneas celulares antes y después de la incubación con agentes proinflamatorios como LPS, ATP o ionomicina. Con respecto a los macrófagos diferenciados, se determinarán los niveles de arginina sintasa y producción de especies reactivas de oxígeno mediante kits colorimétricos y la producción de IL6 e IL8 mediante kits ELISA. También se determinará la translocación de NF- κ B al núcleo y la producción de caspasa 1 mediante microscopía confocal. En relación a los linfocitos, se medirá la expresión de IL2, IL6, IFN γ , TNF α y CXCL8 mediante kits ELISA, así como la variación en la expresión de CD3 y la apoptosis celular mediante citometría de flujo. Finalmente, se estudiará en la línea de neutrófilos la producción de especies reactivas de oxígeno mediante ensayos colorimétricos, la producción de calprotectina mediante kits ELISA y producción de redes de ADN (NETs) y migración celular mediante microscopía.

Tipología: Trabajos experimentales, de toma de datos de campo o de laboratorio.

Objetivos planteados:

1. Estudio del papel regulador de TNSALP en respuesta a estímulos proinflamatorios en Linfocitos, Monocitos y Neutrófilos mediante ensayos in vitro por generación de partículas lentivirales.
 - 1.1. Construcción de plásmidos lentivirales con las variantes del gen ALPL identificadas en la cohorte de pacientes HPP.
 - 1.2. Producción de partículas lentivirales y determinación de la titulación para la transducción de distintas líneas celulares.
 - 1.3. Ensayos de actividad de ALP en las distintas líneas celulares transducidas y ensayos in vitro de inflamación.

Bibliografía básica:

1. Villa-Suárez, J. M. et al. Hypophosphatasia: A Unique Disorder of Bone Mineralization. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4303 (2021).
2. García-Fontana, C. et al. Epidemiological, Clinical and Genetic Study of Hypophosphatasia in A Spanish Population: Identification of Two Novel Mutations in The Alpl Gene. *Sci. Rep.* 9, 9569 (2019).
3. Whyte, M. P. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 233 -246 (2016).
4. Mornet, E. Hypophosphatasia. *Metab. - Clin. Exp.* 82, 142 -155 (2018).
5. Pettengill, M. et al. Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis. *PloS One* 12, e0175936 (2017).
6. Rader, B. A. Alkaline Phosphatase, an Unconventional Immune Protein. *Front. Immunol.* 8, 897

(2017).

7. Narisawa, S., Yadav, M. C. & Millán, J. L. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. J.

Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 28, 1587 -1598 (2013).

Recomendaciones y orientaciones para el estudiante:

Plazas: 1

2. DATOS DEL TUTOR/A:

Nombre y apellidos: EUGENIA ELISABET MONTIEL JIMÉNEZ

Ámbito de conocimiento/Departamento: GENÉTICA

Correo electrónico: eemontiel@ugr.es

3. COTUTOR/A DE LA UGR (en su caso):

Nombre y apellidos:

Ámbito de conocimiento/Departamento:

Correo electrónico:

4. COTUTOR/A EXTERNO/A (en su caso):

Nombre y apellidos: Cristina García Fontana

Correo electrónico: cgfontana@fibao.es

Nombre de la empresa o institución: IBS.granada

Dirección postal: Avda Madrid 15, 18012 Granada

Puesto del tutor en la empresa o institución: Investigadora posdoctoral

Centro de convenio Externo:

5. DATOS DEL ESTUDIANTE:

Nombre y apellidos: PAULA RODRIGUEZ LOZANO

Correo electrónico: paurodriguez@correo.ugr.es