

ACTUALIZACIÓN SOBRE NEURODEGENERACIÓN

Laboratorio de Fisiología de la Conducta
Febrero-Abril 2005
Junio 2005

SERIES

I. INTRODUCCIÓN

II. PATOGENIA MOLECULAR

III. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

IV. FUTURO EN PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO
Y TERAPÉUTICA

Virus adeno-asociado

integración

Vector

amplicón

virus

Terapia Genética

Transgen

Plásmido

retrovirus

clonas

lentivirus

recombinante

ARN

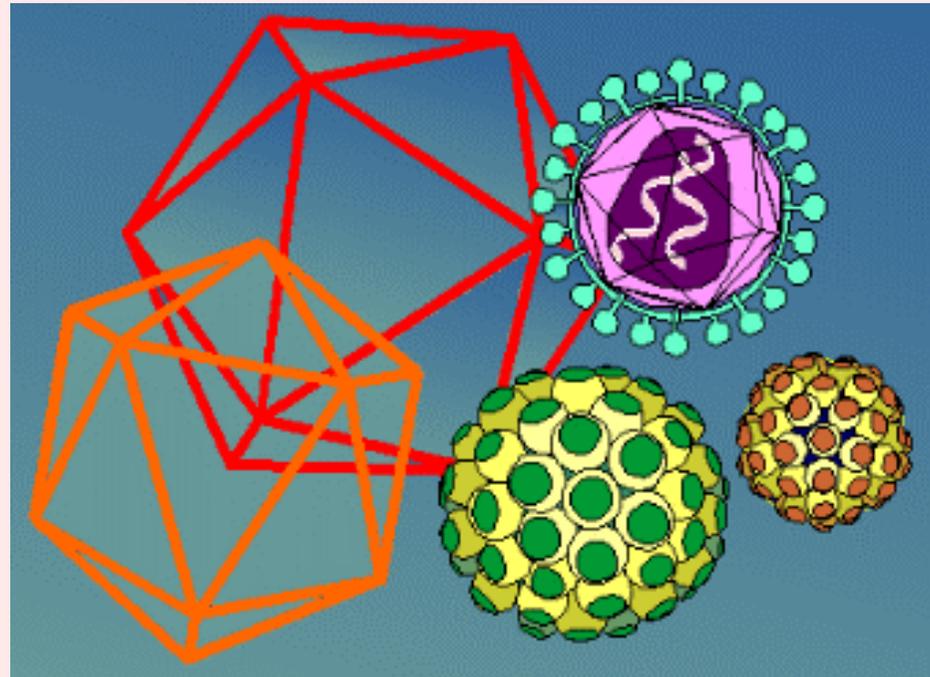
HERPES SIMPLE 1

replicación

Virus "helper"

genoma

USO DE VECTORES VIRALES *IN VIVO* II parte



Laboratorio de Fisiología de la Conducta
2005

Aplicaciones

- * Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas
- * Terapia genética de enfermedades neurológicas

VECTORES
PARA
LLEVAR TRANSGENES
AL
CEREBRO

¿QUÉ QUEREMOS HACER NOSOTROS?

Aplicaciones preclínicas

- * Usar genes que aumenten o disminuyan una determinada función en un área particular del cerebro de ratas
- * Esos genes pueden ser para enzimas, receptores, canales, factores neurotróficos etc.
- * En los casos particulares de enfermedades neurodegenerativas (modelos animales) puede ser para estudiar mecanismos etiopatogénicos o para inducir mejoría

Si tenemos,

1. El transgen de interés insertado en el vector viral apropiado
2. El vector viral en cantidad suficiente como para lograr la expresión genética esperada

Entonces,

Podremos administrar el transgen intracerebralmente simplemente **como una DROGA!**

Vectores virales

- * AAV recombinantes:
Modelo Alzheimer en ratones
- * HSV1 amplicones:
Modelo EP temporal en ratas

Virus Adeno-Asociado

Ventajas

- Poco inmunogénicos
- No son patógenos

Desventajas

- Transgenes pequeños <4kb
- Posible mutación insercional

Virus Herpes Simple 1

Ventajas

- Neurotropismo
- Transgenes grandes

Desventajas

- Son patogénicos
- Inmunogénicos

Tecnología de Terapia Genética

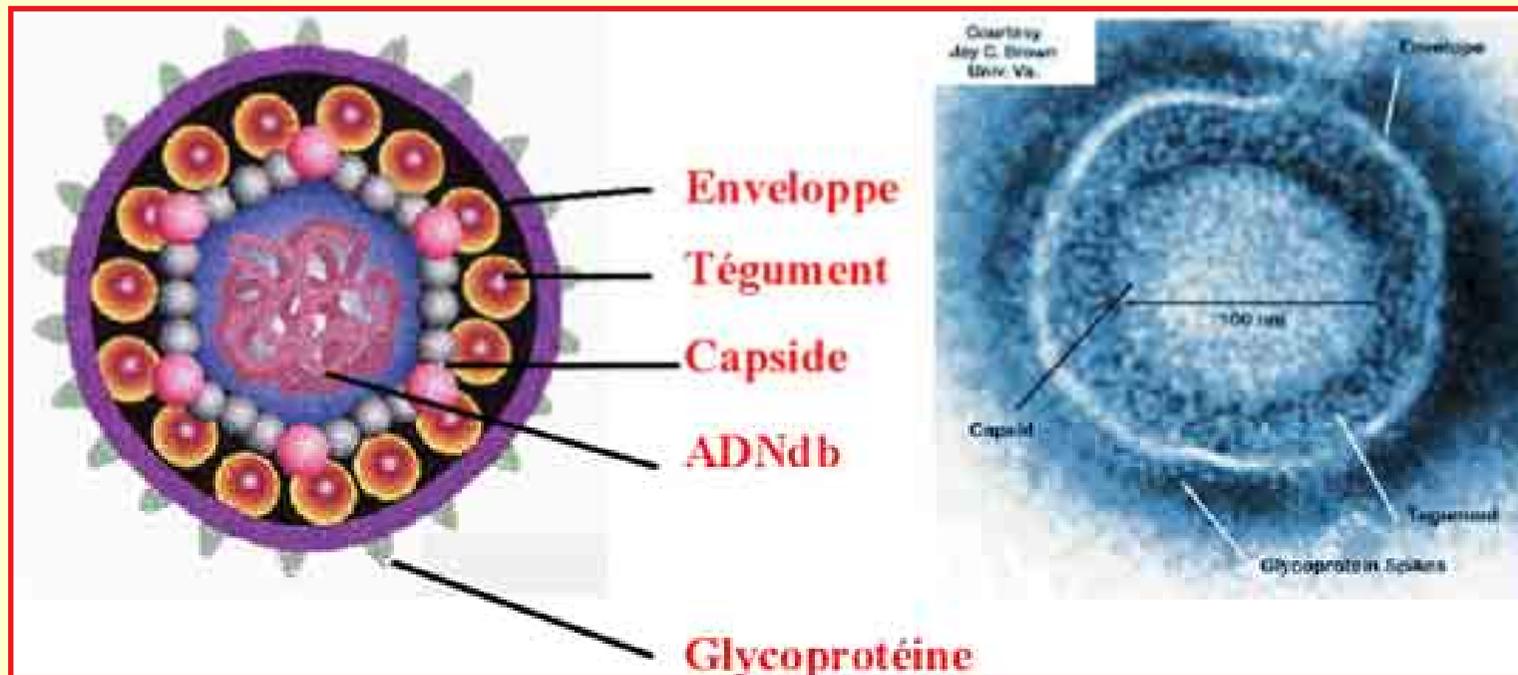
1. CONSTRUCCIÓN TRANSGENES DE INTERÉS
2. PRODUCCIÓN VECTORES VIRALES

Desarrollo de vectores derivados del virus de
herpes simplex tipo 1 (HSV-1)

Alberto L. Epstein
Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire
Université Claude Bernard Lyon I

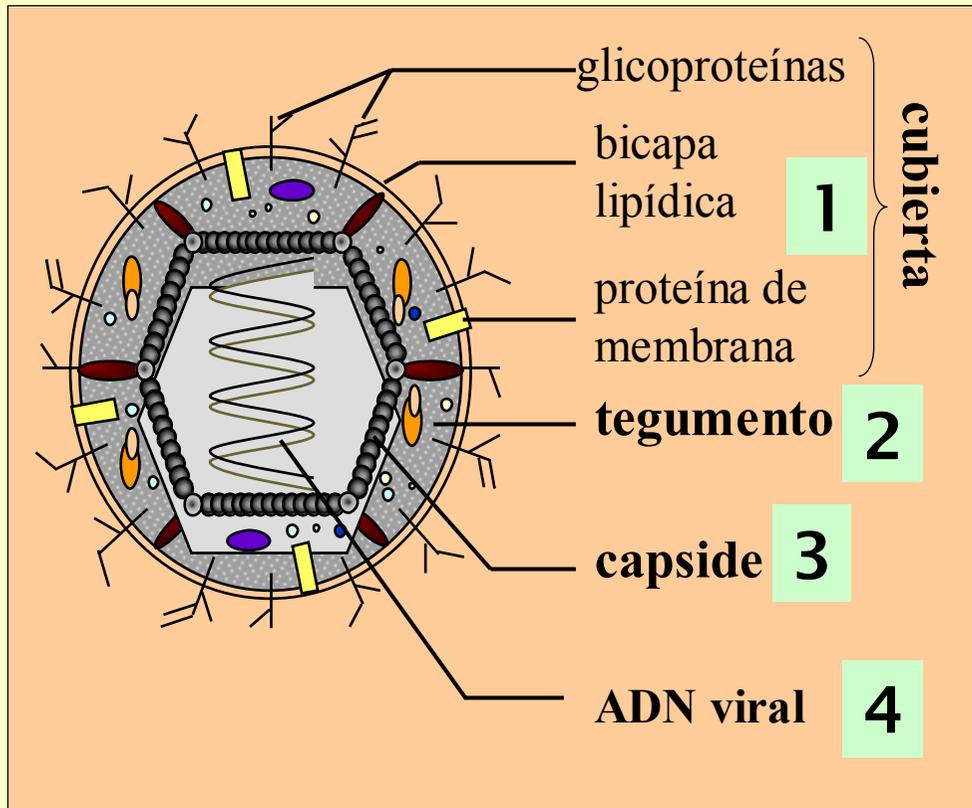


Université Claude Bernard Lyon 1



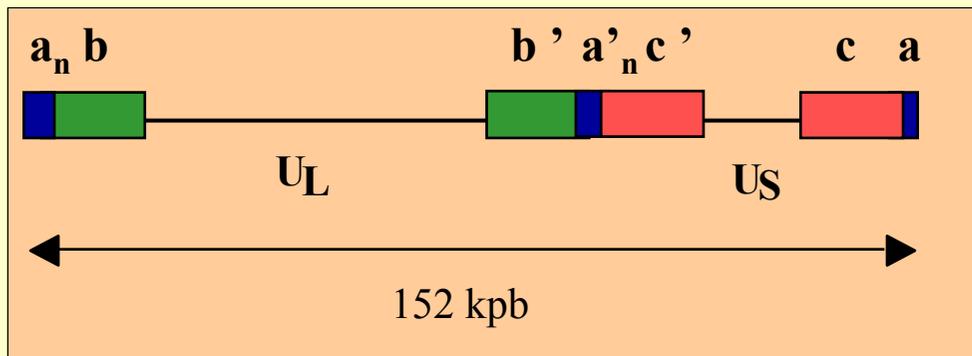
VIRUS HERPES SIMPLE 1

VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO I (HSV-1)



Virus neurotrópico con cubierta

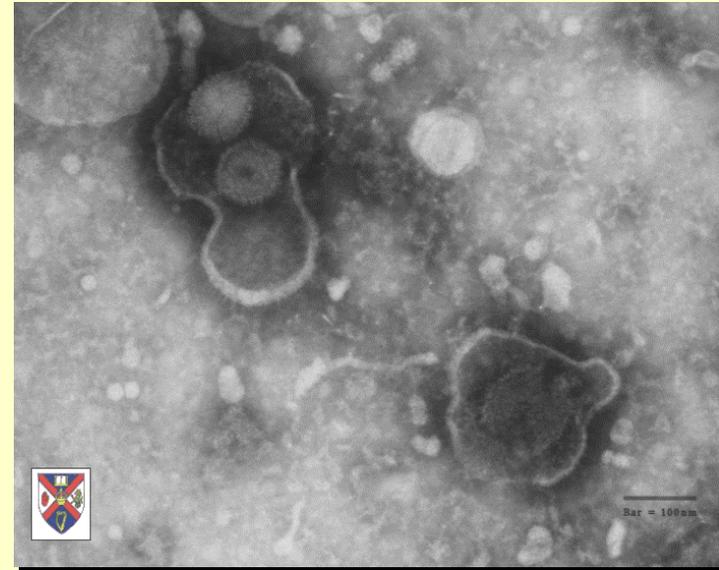
Familia herpesviridae, sub-familia α herpesvirinae

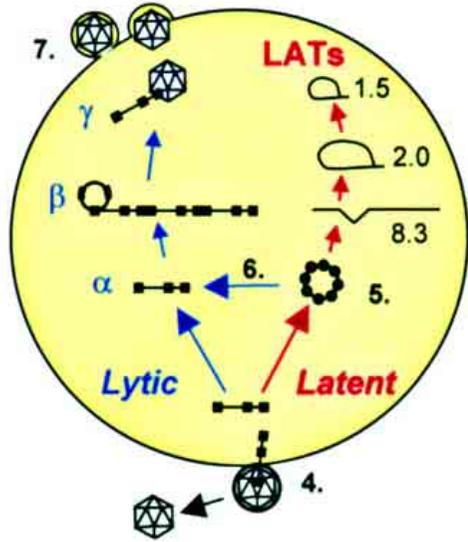


Genoma lineal doble banda de ADN 152kpb

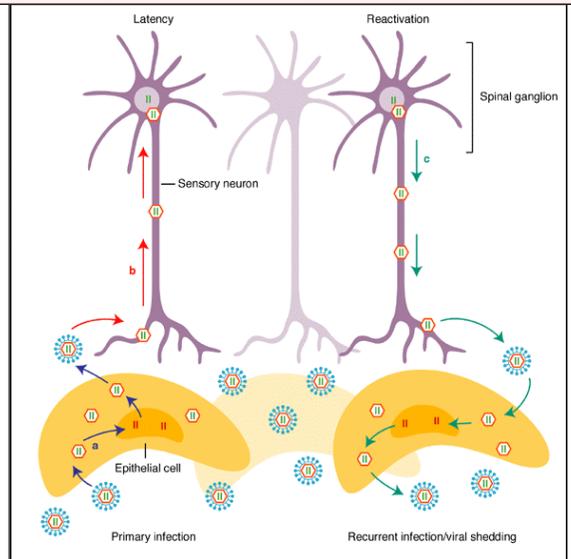
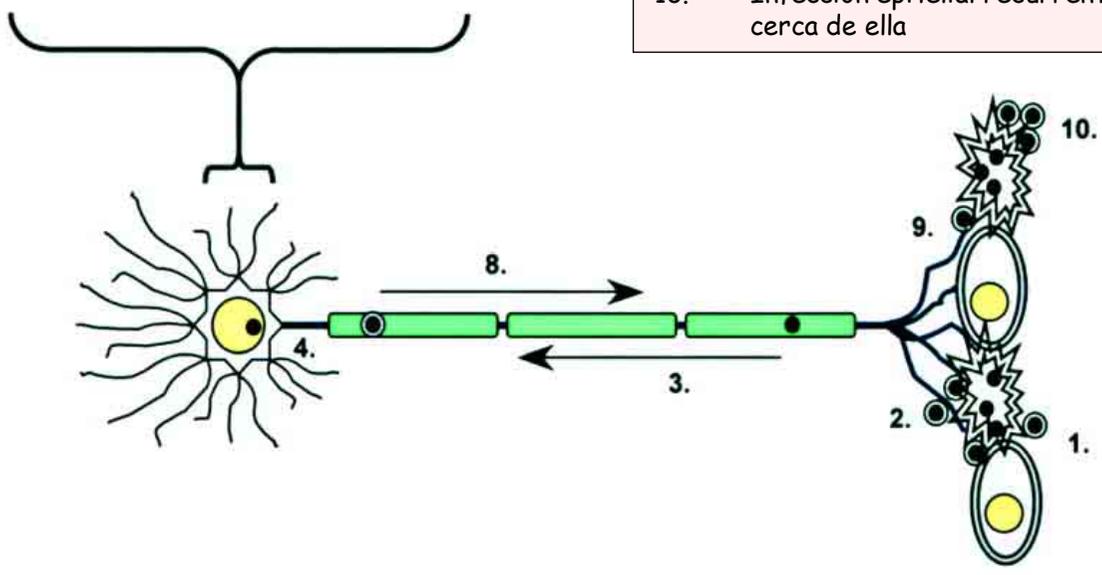
El hombre es el huésped natural del HSV

La infección es casi universal, casi todos los adultos son seropositivos



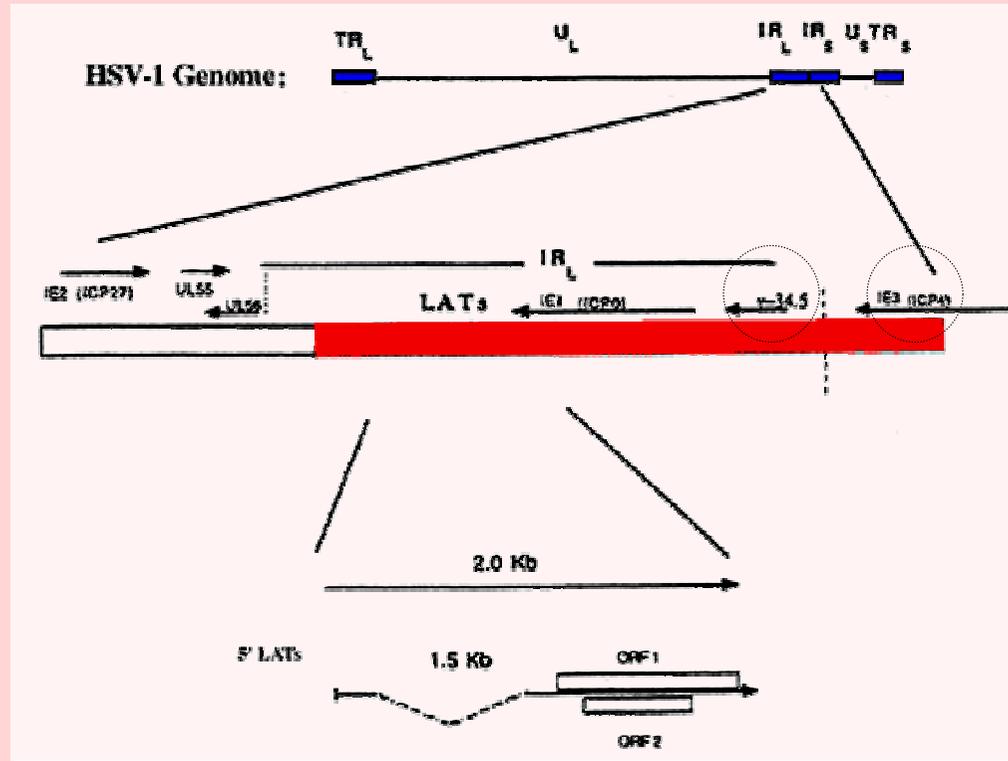


1. Replicación lítica en la puerta de entrada epitelial
2. Viriones liberados del epitelio entran en los terminales sensoriales
3. Nucleocápside y tegumento van por transporte axónico retrógrado al soma
4. ADN viral entra al núcleo e inicia cascada **lítica** de expresión genética o se vuelve **latente**
5. Durante la latencia el genoma viral permanece episomal o nuclear, sólo los genes LAT se expresan
6. Inmunosupresión, enfermedad intercurrente u otros estímulos "reactivan" la infección lítica
7. Los viriones son formados por gemación de la membrana nuclear
8. Nucleocápside y glicoproteínas transportadas separadamente por transporte axonal anterógrado
9. Ensamblaje del virion y salida del terminal
10. Infección epitelial recurrente en el sitio de la lesión primaria o cerca de ella



The herpes simplex virus life cycle
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press

Genoma Virus Herpes Simple 1



° Doble banda de ADN lineal 152Kb

Tiene **81 genes**, la mitad no esenciales que pueden reemplazarse por 40-50kb de genes extraños

GENES principales para la REPLICACIÓN

1. Alfa o tempranos inmediatos:
ICPO, **ICP4**, ICP22, ICP27, ICP47 que
son factores transactivantes que
permiten producción de los
2. Tempranos :codifican para metabolismo de
nucleótidos y **replicación de
ADN**
3. Tardíos : activados por los anteriores y
codifican para **proteínas estructurales**

VECTORES DERIVADOS DE HSV-1

Tropismo variado, neurotropismo

Células mitóticas y post-mitóticas

Se mantienen como episomas

Genoma de 152 kpb

Vectores derivados de HVS1

- * Recombinantes

- * **Amplicones**

Recombinantes HSV1

* Son virus con **replicación deficiente** por eliminar uno de los genes tempranos inmediatos como **ICP4**

* Son **menos patogénicos** y pueden dirigir la expresión del transgen en el cerebro

Amplicon

Un término para cualquier pequeño fragmento replicante de ADN

Amplicones HSV1

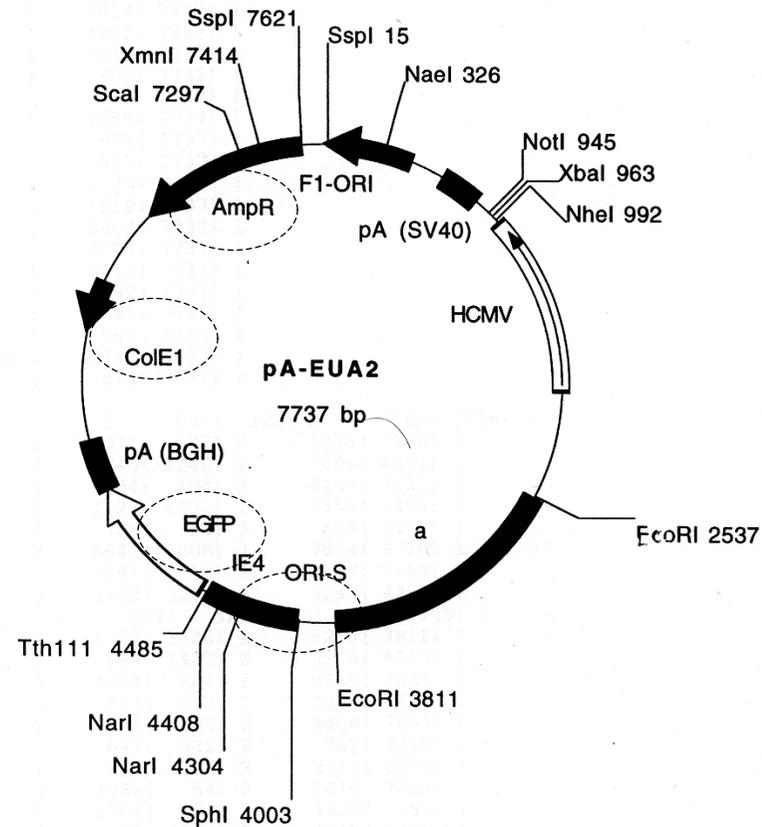
Plásmidos producidos en bacterias que tienen:

1. Sitio de origen de replicación de *E. coli* (col E ori)
2. Sitio de origen de replicación de HSV 1 (OriS)
3. Secuencia de empaquetamiento de HSV 1
4. Transgen bajo control de un promotor temprano inmediato
5. Marcador seleccionable

Plásmido amplicón pA-EUA2

CGMC (Lyon)

- colE1
- oriS
- Resist. Ampicilina
- GFP
- HCMV promotor



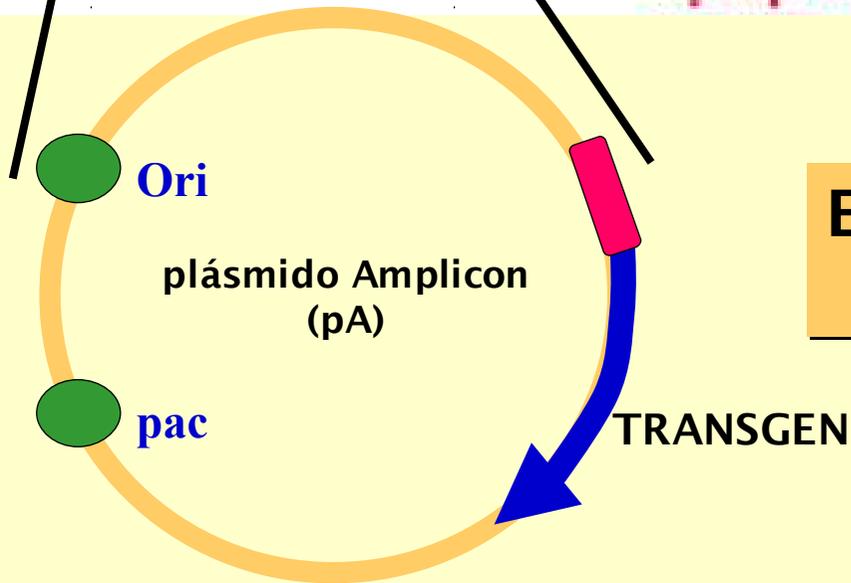
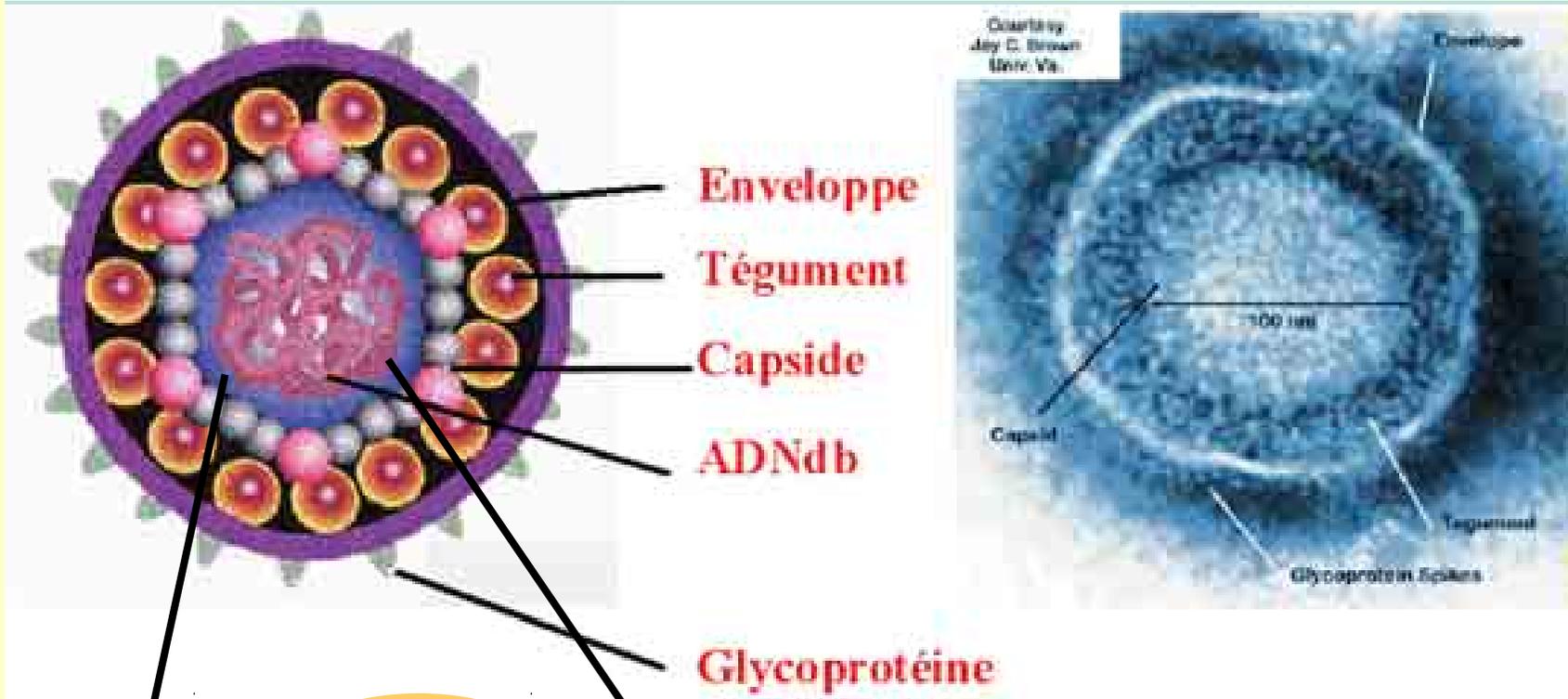
Plasmid name: pA-EUA2

Plasmid size: 7737 bp

Constructed by: Valerie Revol

Construction date: Mai 2000

Comments/References: Introduction d'un fragment (BglII-BE/BamHI-BE) de 1350 nt contenant le promoteur HCMV, le polylinker, et la sequence poly-A de SV40 du plasmide pCI (Promega), dans le site KpnI-BE du polylinker PL1 du plasmide amplicon pA-EUA1



**EL VECTOR AMPLICON
HSV-1**

VECTORES AMPLICONES

1. Desprovistos de genes virales

- ausencia de toxicidad
- capacidad de transferir >130 kpb ADN exógeno

2. Expresión TRANSITORIA

3. Construcción de plásmido amplicón fácil y rápida

4. Necesidad de un virus AUXILIAR para su producción, que provea los genes reguladores y estructurales que faltan para replicación y empaquetamiento de las partículas virales

VIRUS DEFECTUOSO AUXILIAR (HELPER) HSV1-LaIΔJ

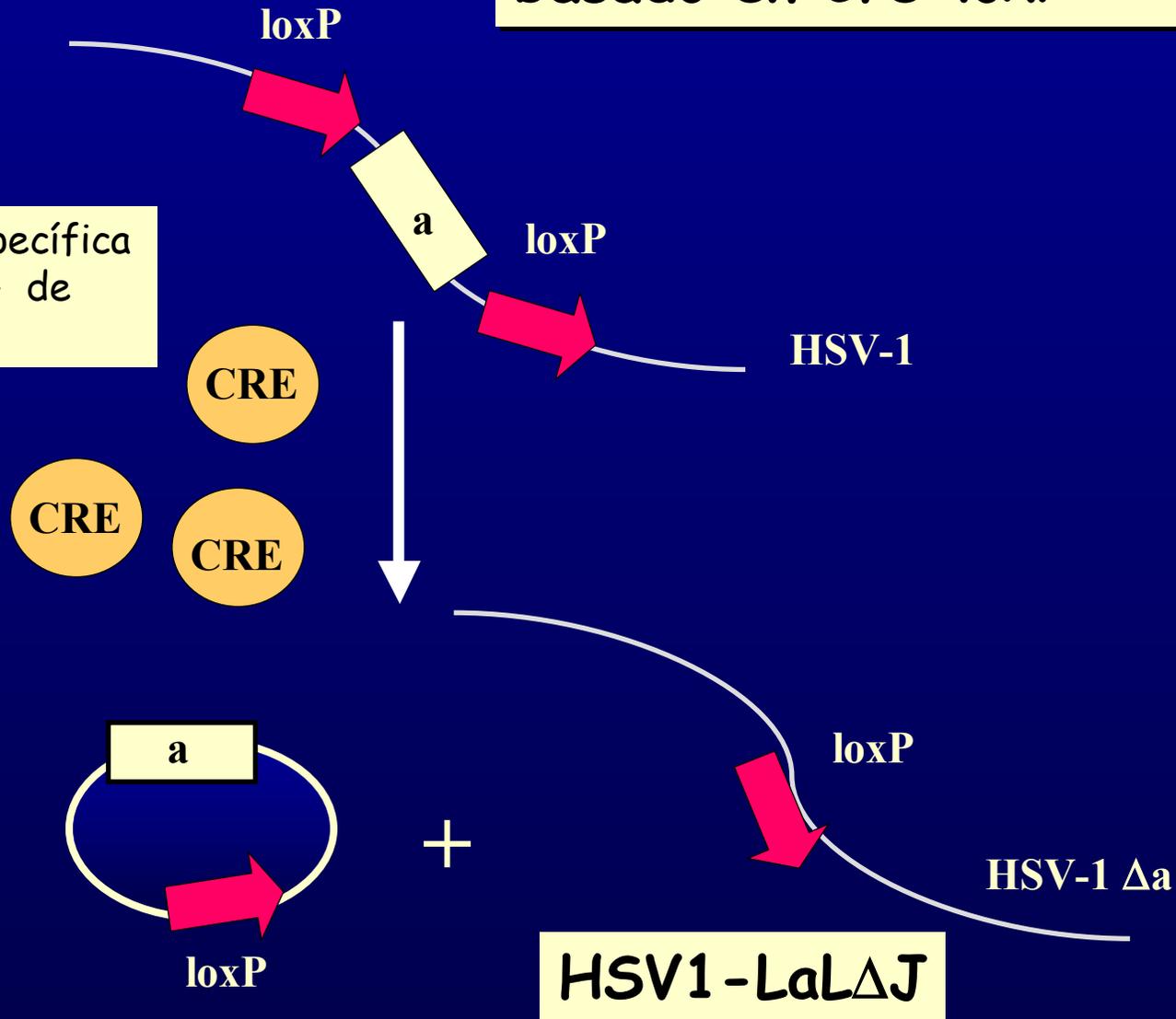
Barreras de seguridad independientes:

- * Carece de los GENES que codifican para,
 - proteína esencial ICP4
 - factor de virulencia ICP34.5

- * No se empaqueta durante la producción de vectores amplicones, por tanto se producirán muy pocos helpers que es lo deseable

Sistema auxiliar (helper) basado en Cre-loxP

Delección Sitio-específica de secuencias «a» de empaquetamiento

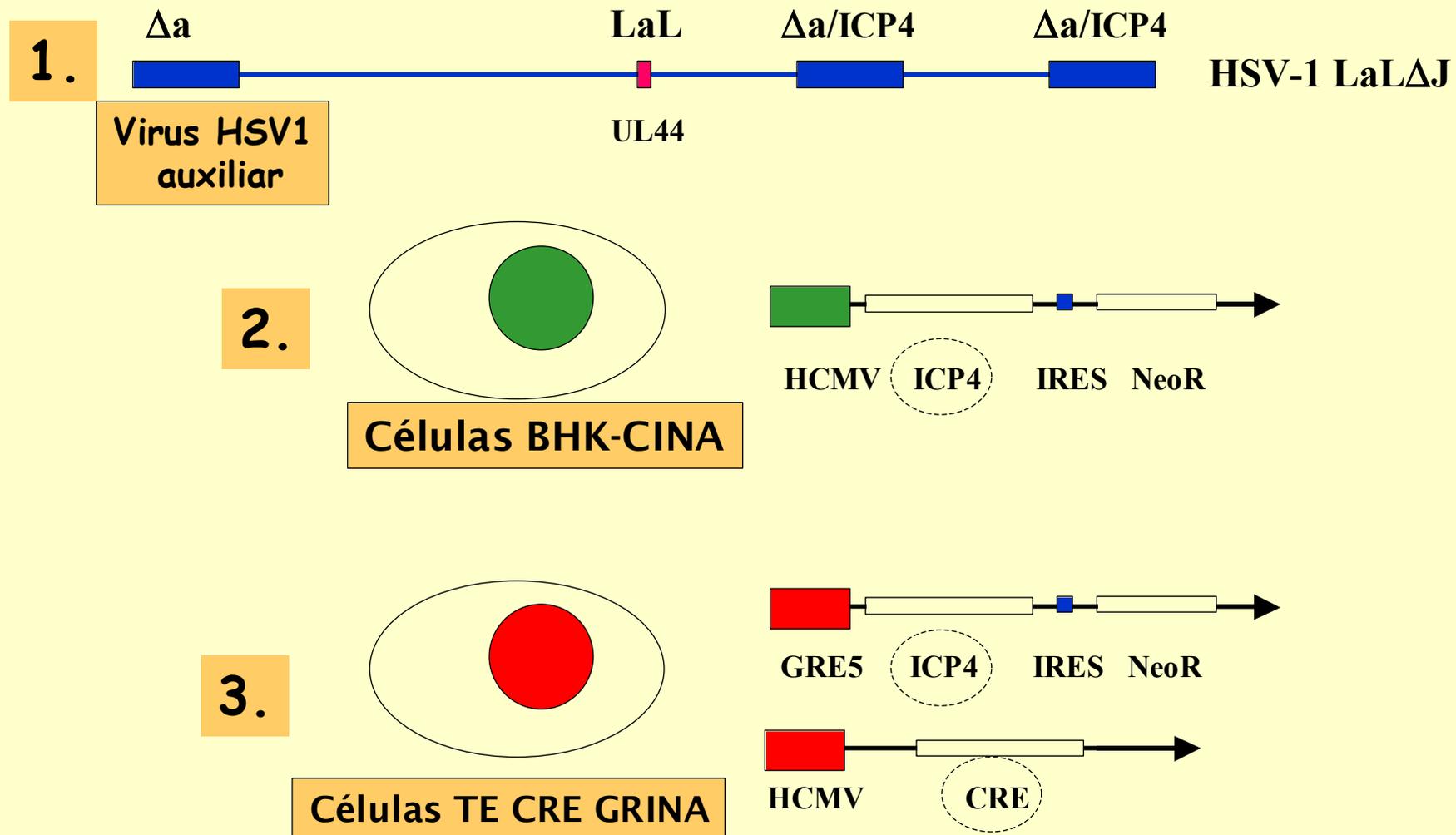


HSV1-LΔJ

Elementos del nuevo sistema de producción de vectores amplicones

- * Virus HSV-1 LaLdeltaJ (virus auxiliar):
 - defectuoso (no tiene ICP4; ICP34.5)
 - encapsidación inhibida en presencia de recombinasa Cre
- * Línea celular BHK CINA (ICP4+)
- * Línea celular TE CRE GRINA (ICP4+; Cre+)

El sistema HSV-1 LaL- Δ J/TE CRE GRINA



Producción de AMPLICONES HSV1

CGCM, Lyon Francia

Etapa I

Día 0: Células BC6 (BHK que expresan ICP4)

Día 1: Transfección con pA-transgen

Día 2: Super-infección con virus defectuoso helper LaLΔJ

Día 3: Esperar

Día 4: Recoger **STOCK 1**:

vector amplicón + virus helper

Etapa 2

Día 0: Células TE CRE GRINA 129 (expresan ICP4 y CRE)

Día 1: Infección con STOCK 1

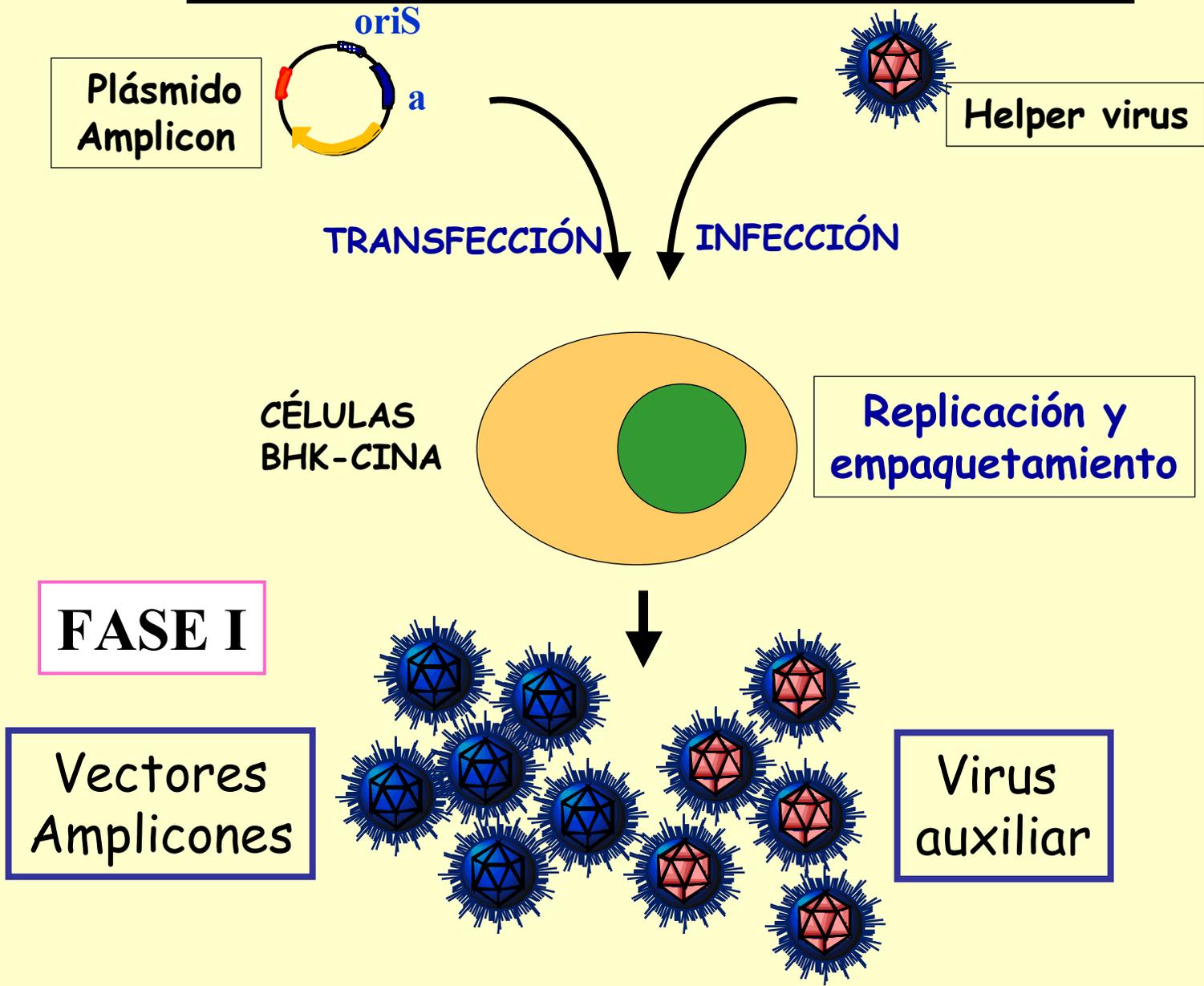
Día 2: Recoger **STOCK 2**:

vectores amplicón 5×10^6

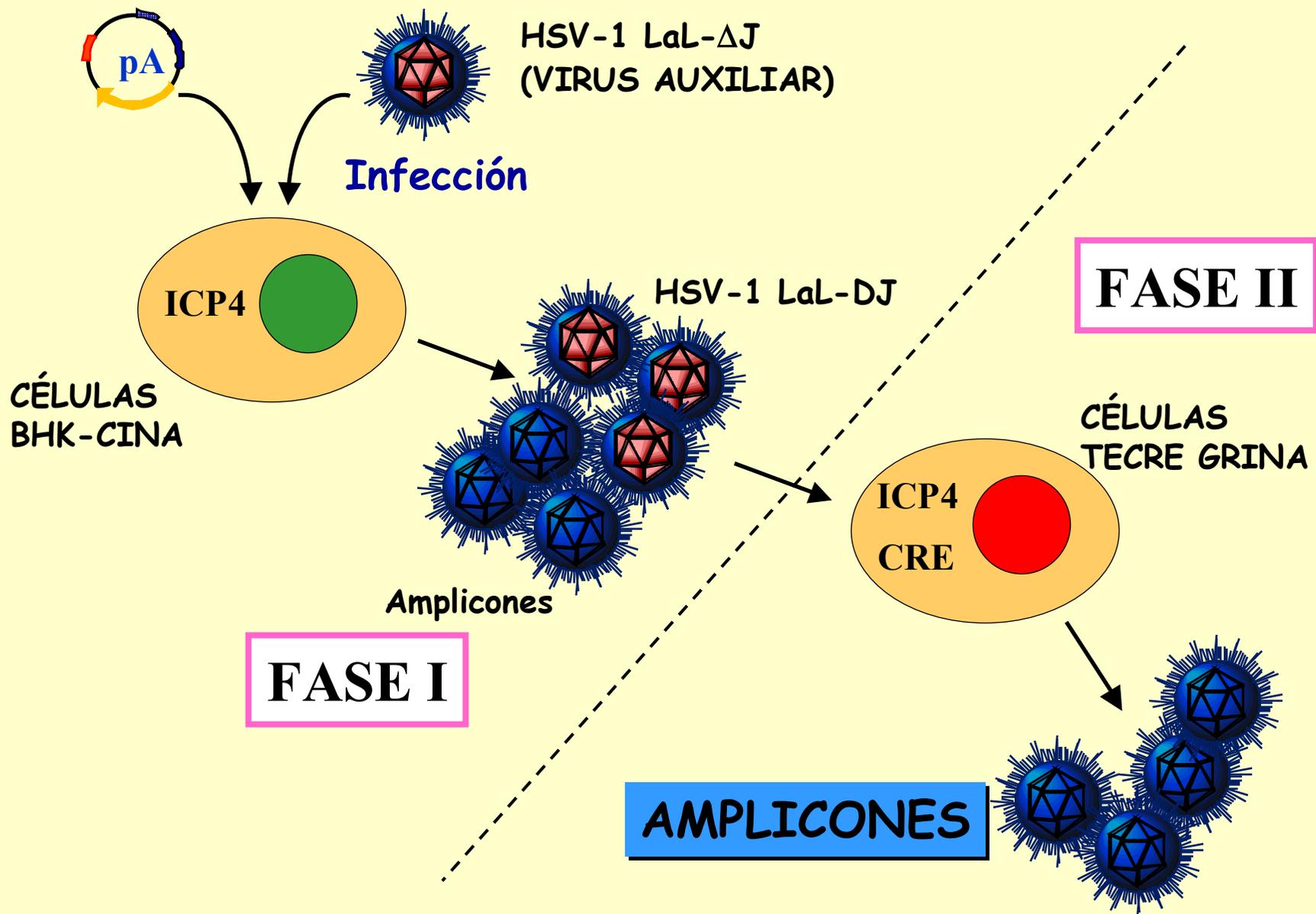
1% max de contaminación 5×10^4

Titulación al final de cada etapa

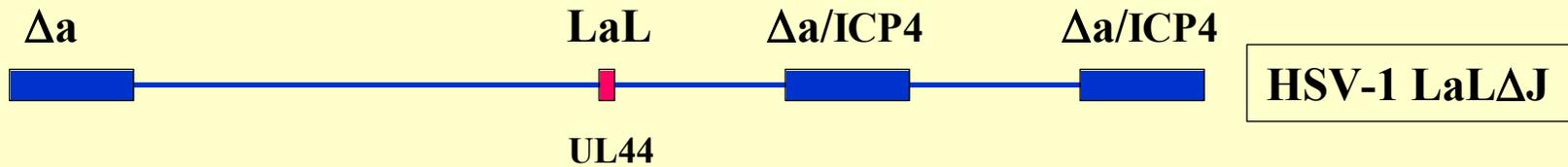
Producción Vectores Amplicones



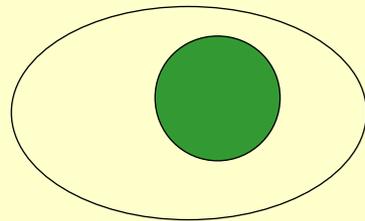
Producción Amplicones usando el sistema LaL- Δ J



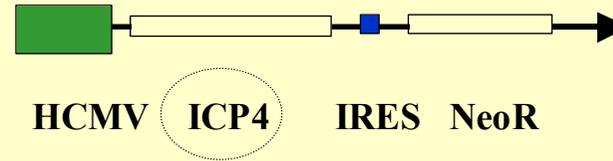
El sistema HSV-1 LaL-ΔJ/TE CRE GRINA



FASE I

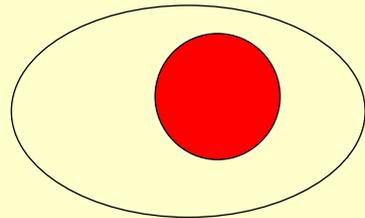


Células BHK-CINA

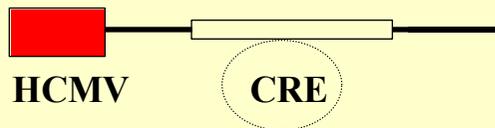
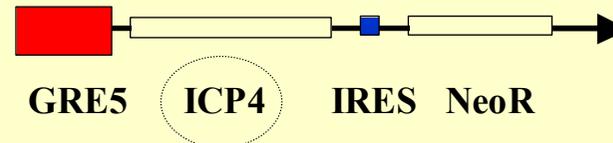


Amplicones +
Helper virus
3:1

FASE II



Células TE CRE GRINA



Amplicones +
Helper virus
200:1

TITULACIÓN

Amplicones células Gli 36 (glioblastoma)

Día 0: Células Gli 36

Día 1: infección

Día 2: contar número de **células GFP+**

Virus helper células E5 (Vero que expresan ICP4)

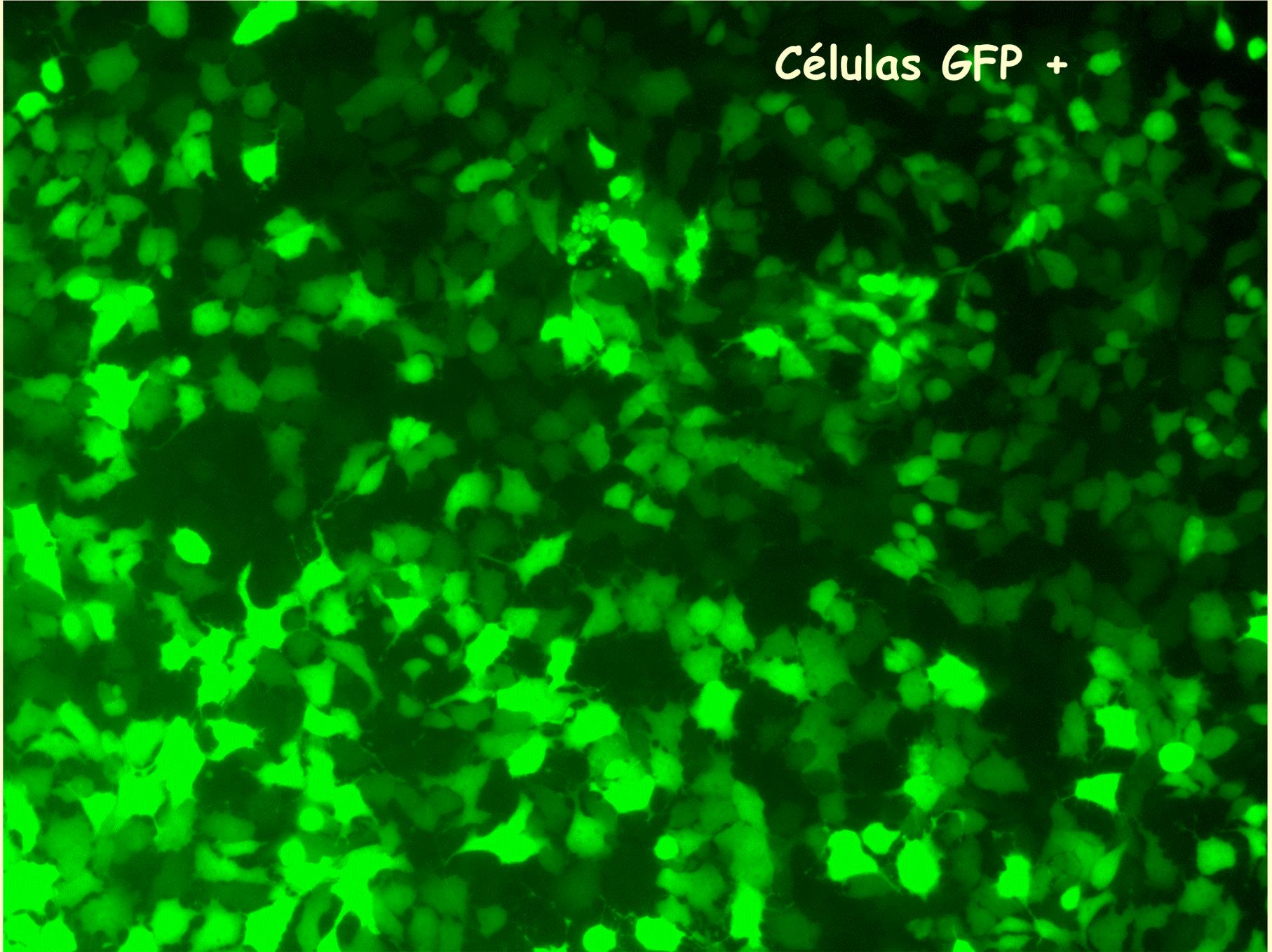
Días 0 y 1: igual a amplicón

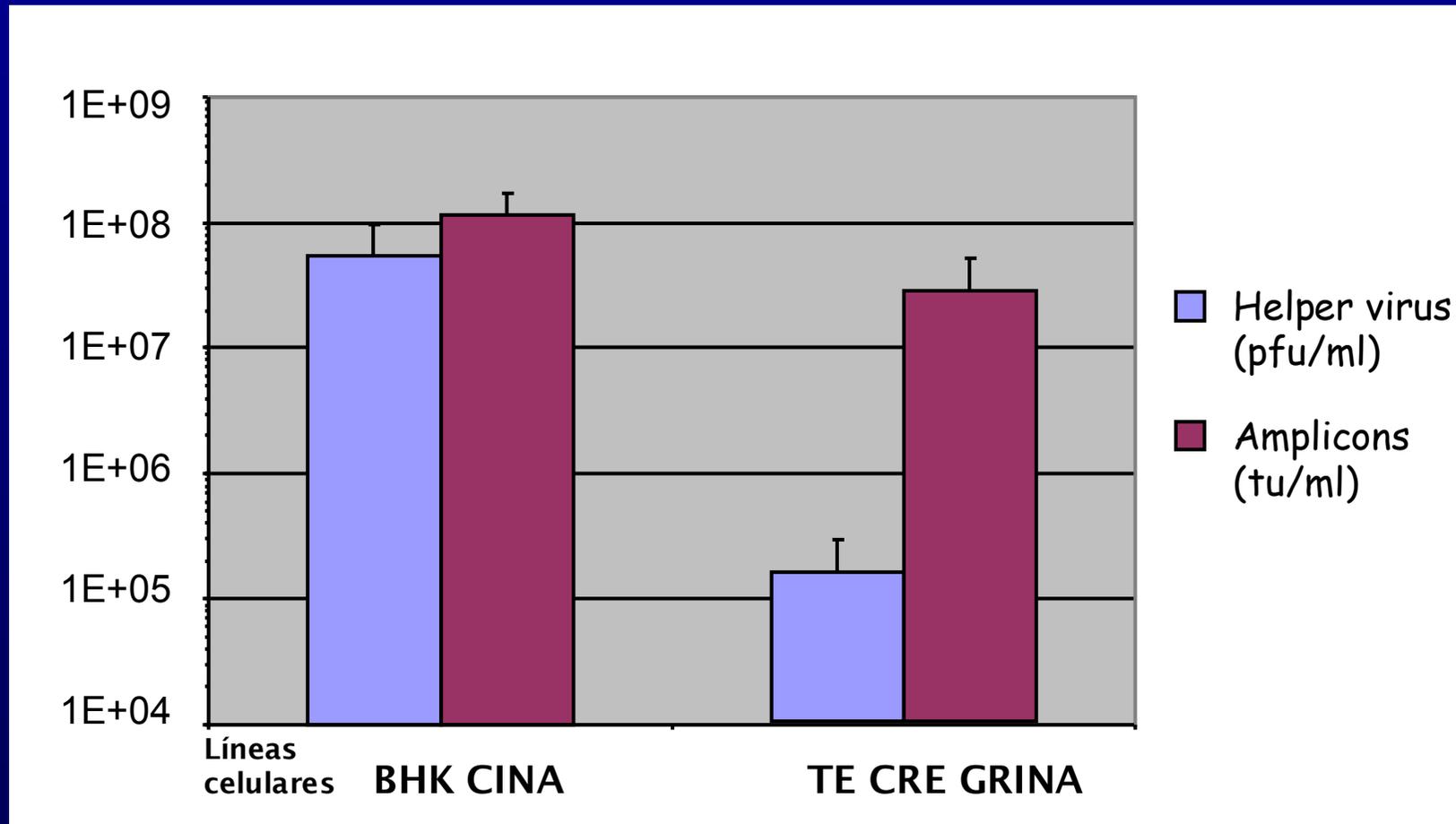
Días 3 y 4: contar número de **placas de lisis**

Recombinante células Vero (African green monkey kidney)

Igual a E5: ver signos de **citotoxicidad**

Células GFP +



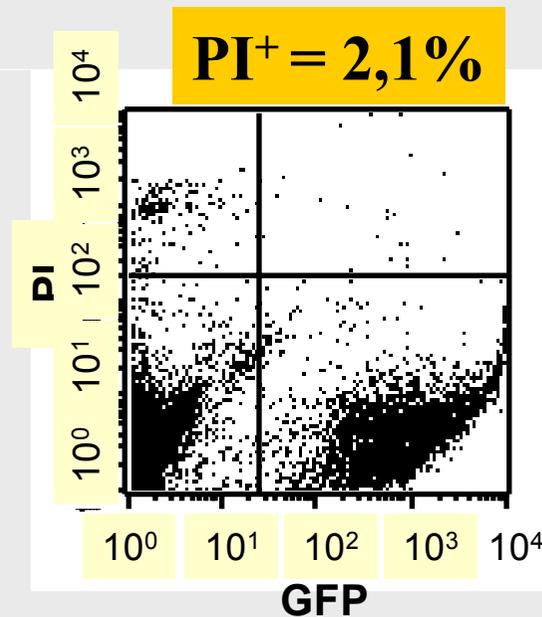
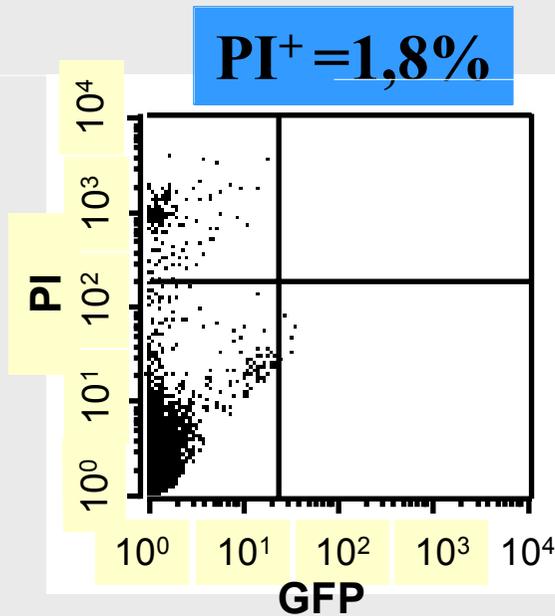
PRODUCCIÓN DE VECTORES AMPLICONES CON EL SISTEMA LAL- Δ J

En células BHK-CINA, la razón vector/auxiliar es 3:1

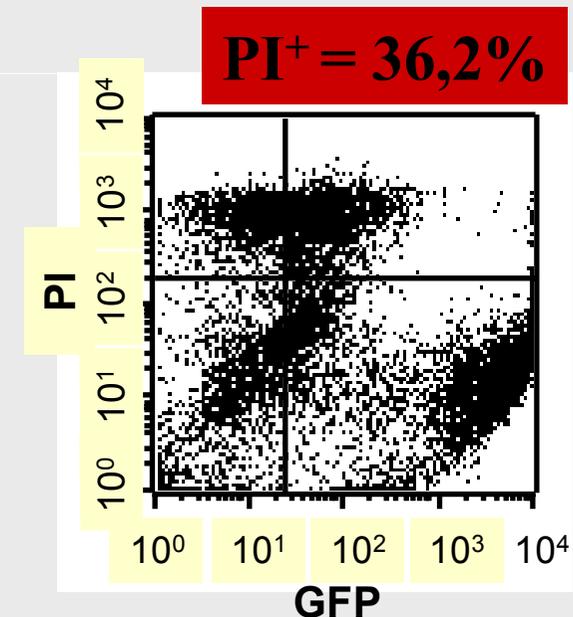
En células TE CRE GRINA, la razón vector/auxiliar es 200:1

**Ausencia de citotoxicidad de VECTORES AMPLICONES (48 p.i)
Marcaje con ioduro de propidium (PI)**

Línea celular Gli36

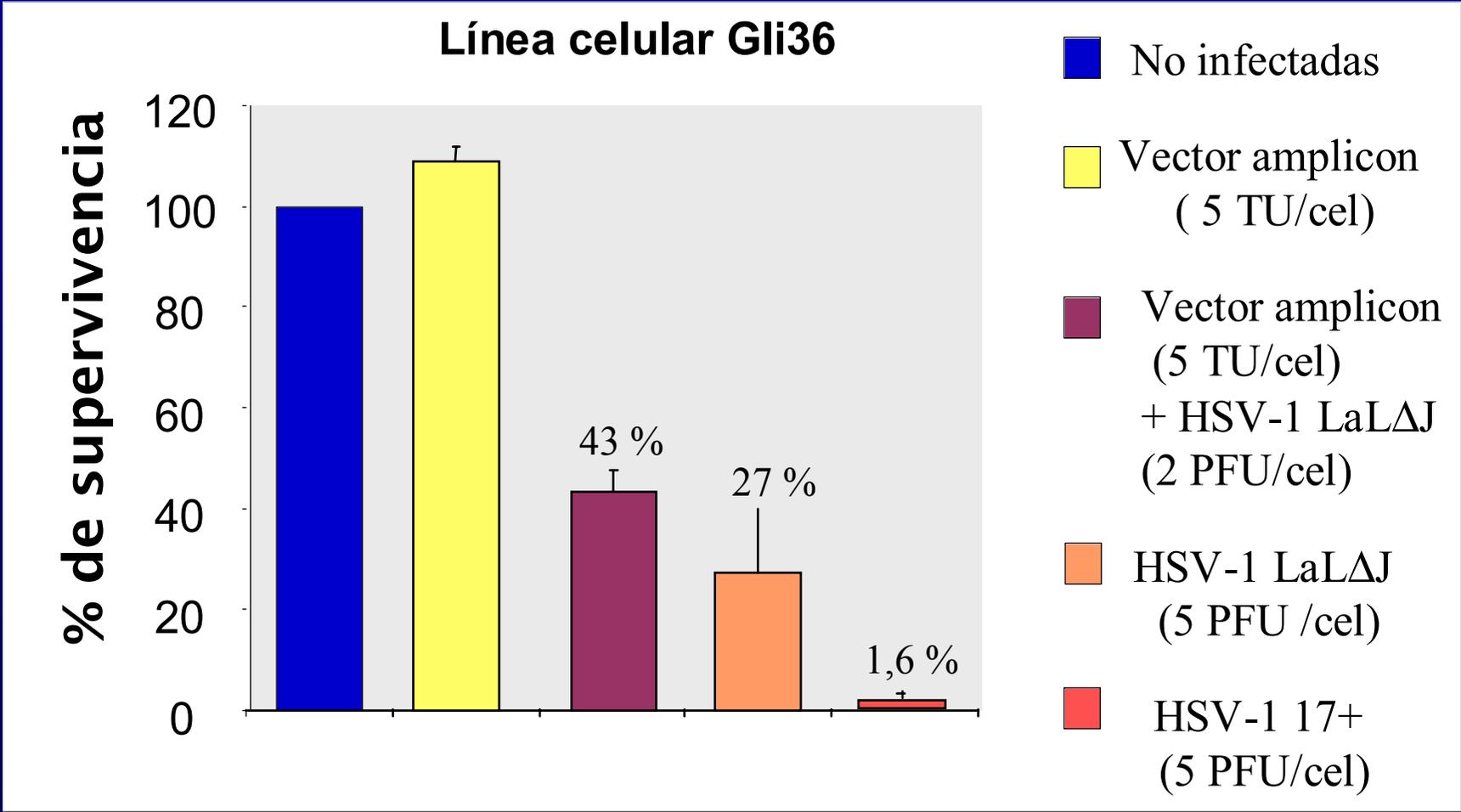


**Vector amplicon
(5 TU/cell)**

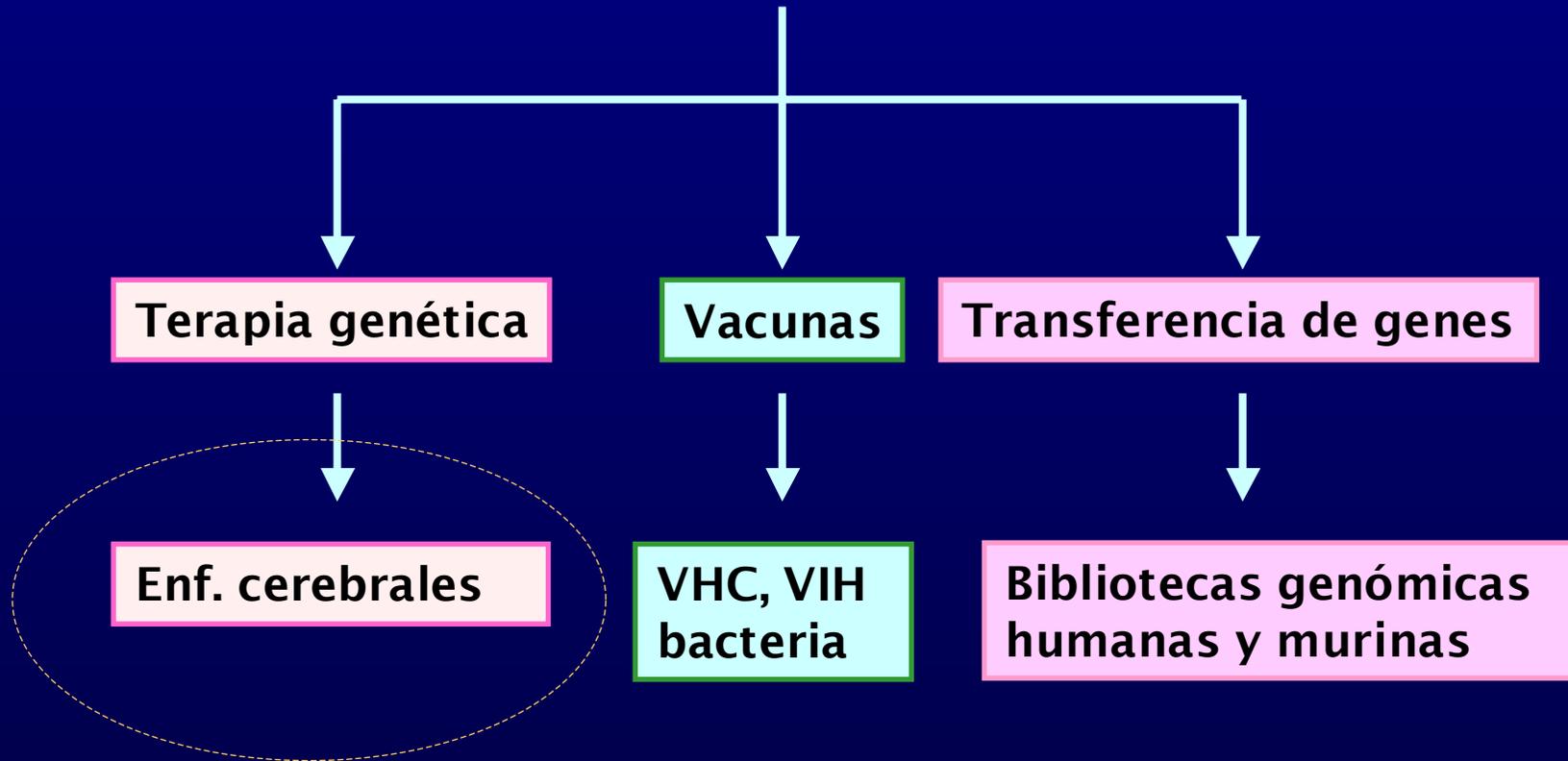


**Vector amplicon (5 TU/cell)
+ HSV-1 LaLDJ (2 PFU/cell)**

**AUSENCIA DE CITOTOXICIDAD DE
VECTORES AMPLICONES (48 P.I.)
(coloración cristal violeta)**

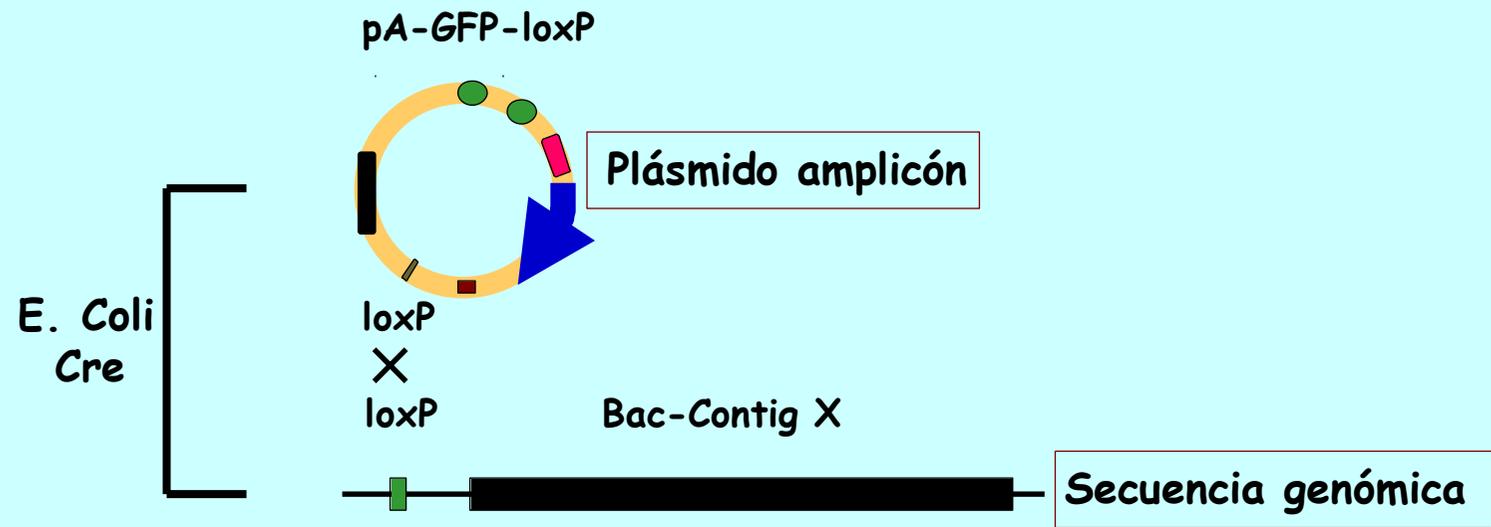


VECTORES AMPLICONES derivados de HSV-1

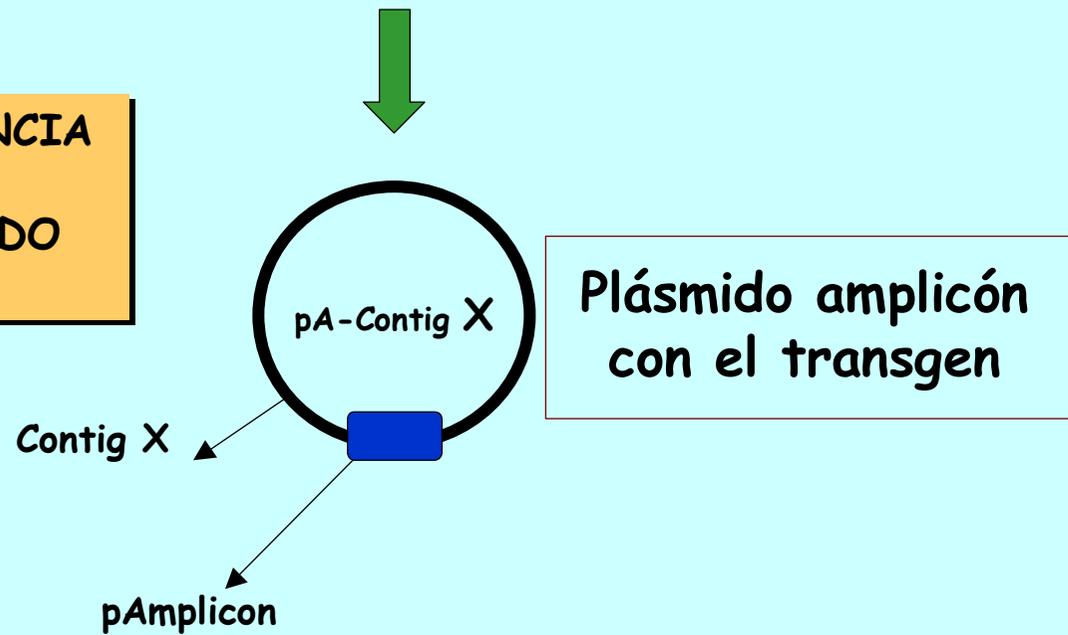


PROCESO DESDE DISEÑO HASTA LA PRODUCCIÓN DE UN VECTOR

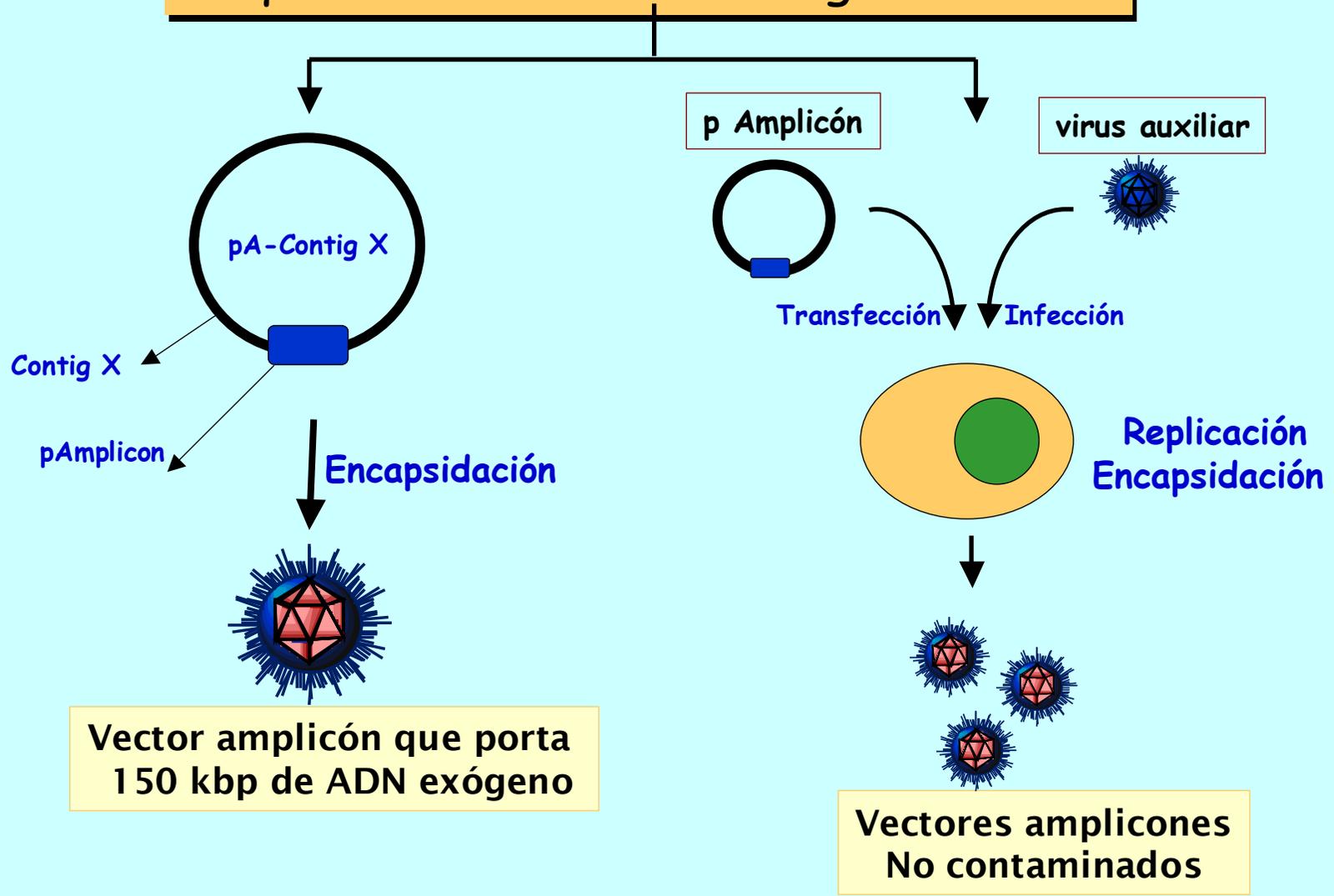
1. Diseñar el "INSERTO"
2. Hacer el plásmido con el transgen
3. Amplificar plásmido VECTOR y VIRUS HELPER
4. Producir VECTORES



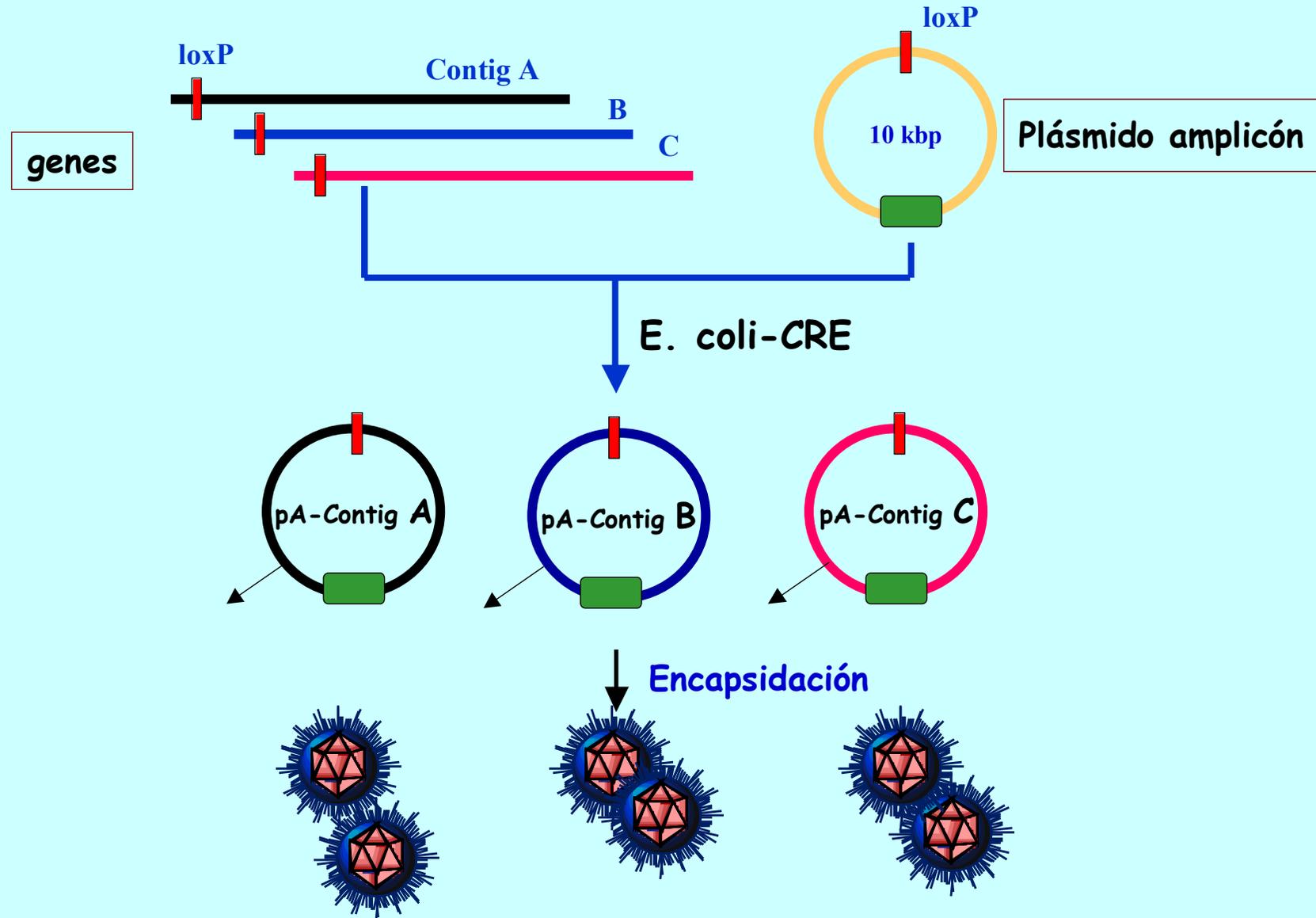
CLONAJE DE UNA SECUENCIA
GENÓMICA
DENTRO DE UN PLÁSMIDO
AMPLICÓN



Construcción de un plásmido amplicón que lleva una secuencia genómica



Clonaje de la biblioteca genómica humana en amplicones



Vectores virales

- * AAV recombinantes:
Modelo Alzheimer en ratones
- * HSV1 amplicones:
Modelo EP temporal en ratas

* **Modelo de EPILEPSIA**

Parcial Compleja, o del lóbulo temporal
(ratas TRANSGÉNICAS)

VECTOR: HSV1 amplicon

Gen: enzima glutamato decarboxilasa (GAD)

GEN REPORTERO: GFP junto con el transgen

CGMC (Lyon, Francia)

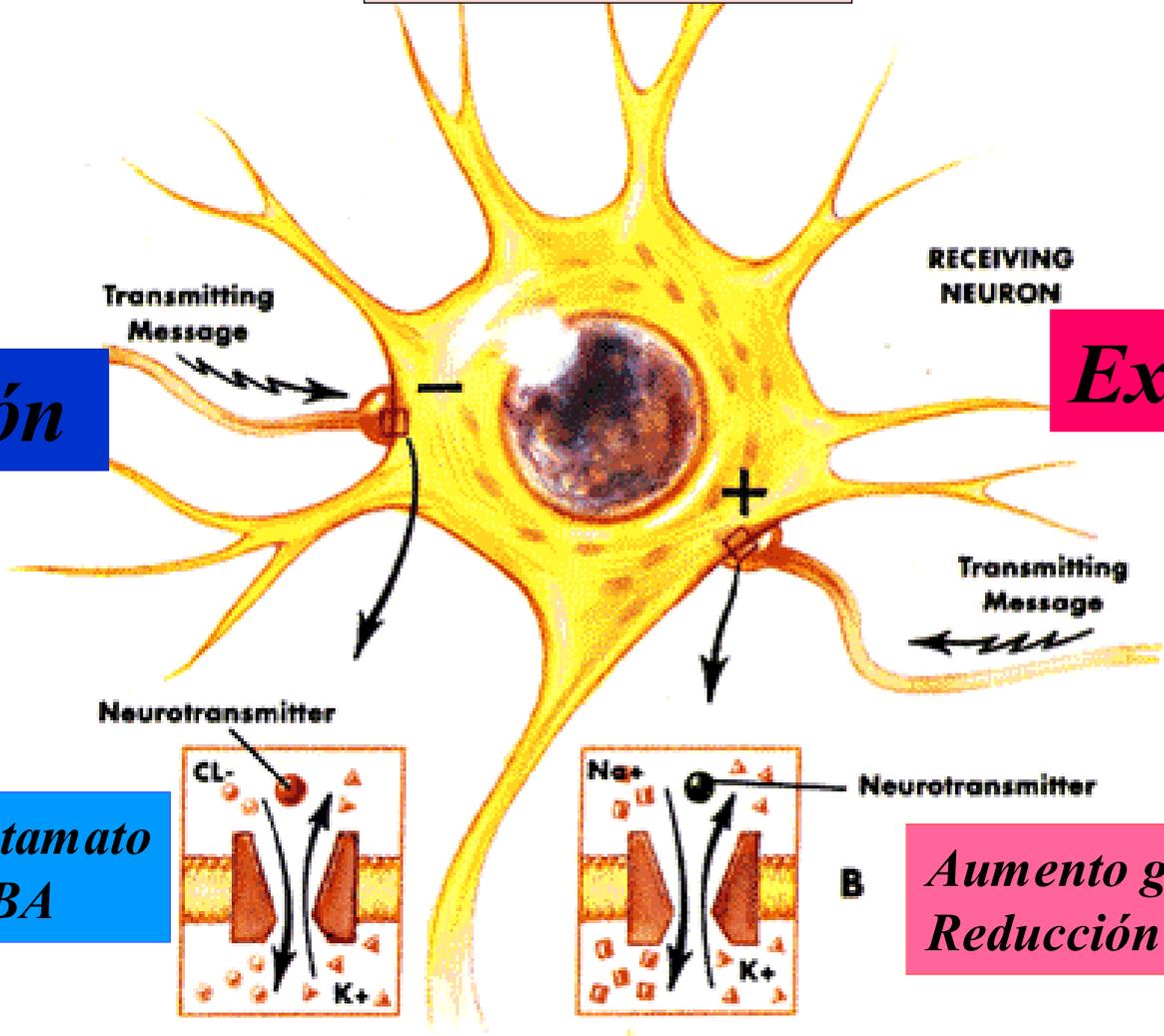
¿Qué es EPILEPSIA?

- * Crisis recurrentes que resultan de descargas anormales en el cerebro
Alteración de conciencia, movimiento o sensación
- * Causas desconocidas
Predisposición genética a heredar umbral bajo para descargas en algunos casos
Trauma, infección, tumor o ACV
- * No hay cura, puede haber buen control farmacológico

BALANCE

Inhibición

Excitación



*Reducción glutamato
Aumento GABA*

*Aumento glutamato
Reducción GABA*

Epilepsia

Aumento de excitabilidad y/o
Disminución de inhibición en la
función cerebral

Síndrome EPILEPTICO

1. Exceso función excitadora (↑ Glutamate)
2. Déficit función inhibitora (↓ GABA)
3. Exceso de función Na⁺ canales

Síndrome epiléptico:

- * **Crisis generalizadas (*Grand Mal, ausencias*):**

 - Involucra todo el cerebro

 - Pérdida de conciencia

- * **Crisis parciales:**

 - Involucra sólo una parte del cerebro

 - No siempre hay pérdida de conciencia

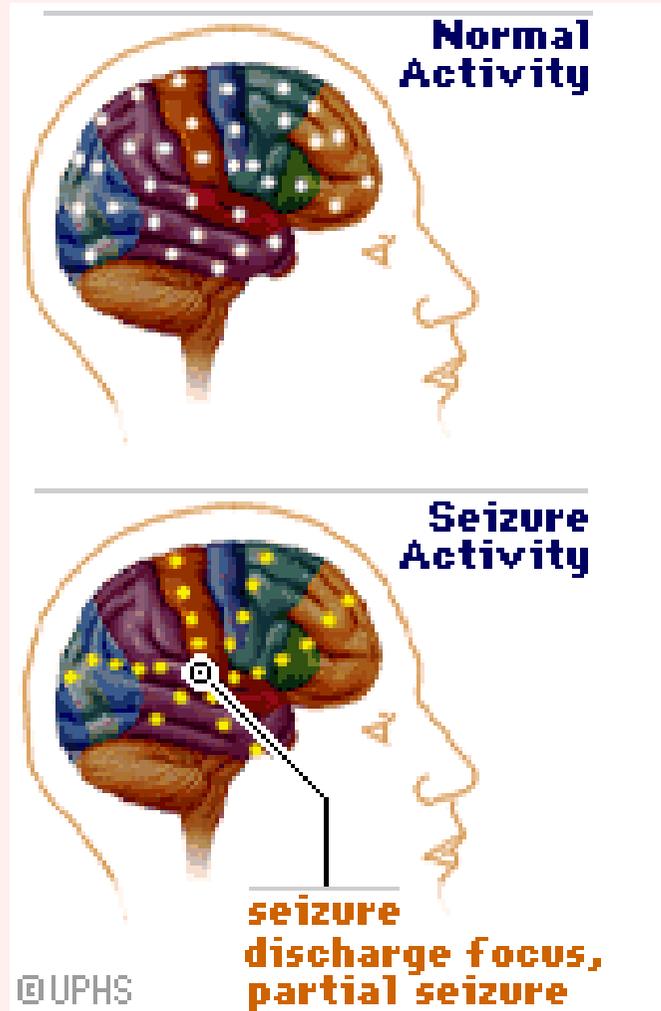
 - 1. **Simple**

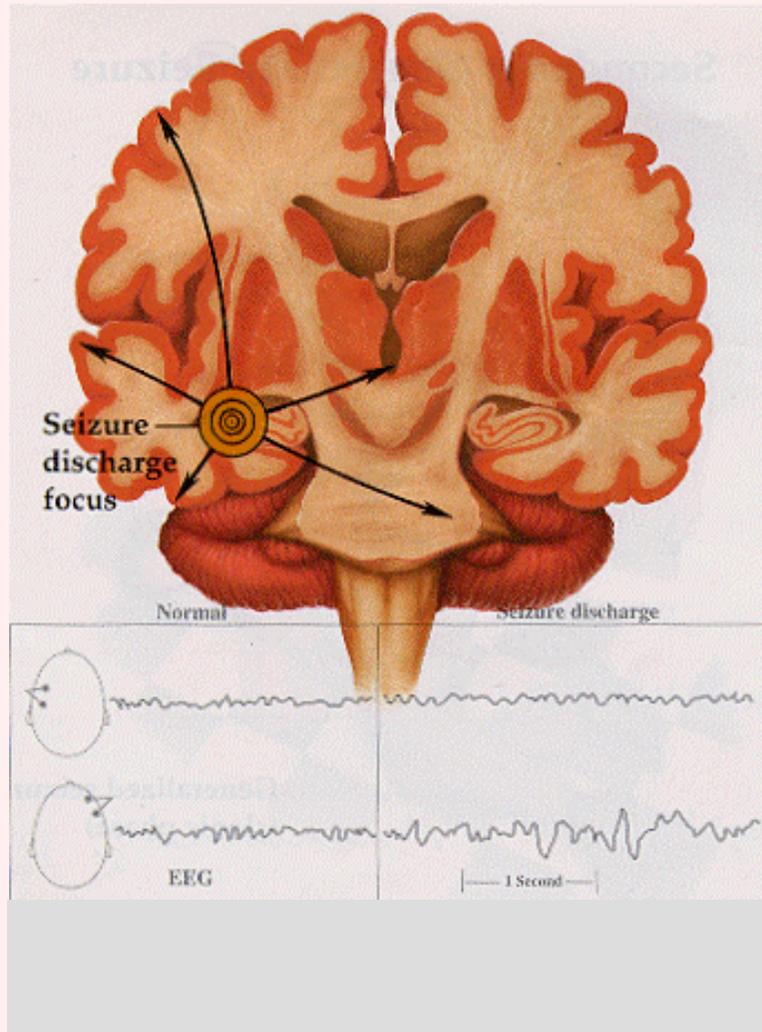
 - Sensaciones o movimientos locales no usuales

 - 2. **Compleja (EP temporal)**

 - Una disminución en el estado de conciencia con movimientos repetitivos

Epilepsia Parcial





EP del Lóbulo Temporal

EP compleja parcial puede comenzar en una pequeña área del lóbulo temporal: **AMÍGDALA**, parte del sistema límbico

Estos pacientes presentan **alteraciones del estado de conciencia** y con frecuencia síntomas psíquicos

Epilepsia parcial compleja (psicomotora or temporal)

- * Deterioro de la conciencia
- * Compleja distorsión de sensaciones y pensamiento (gozo, temor, sonidos, olores)
Actividad motora parcialmente coordinada (automatismos)
- * Con frecuencia difícil de controlar
Tratamiento quirúrgico para 30% de casos
(sólo 50%-60% mejoran)

"KINDLING"

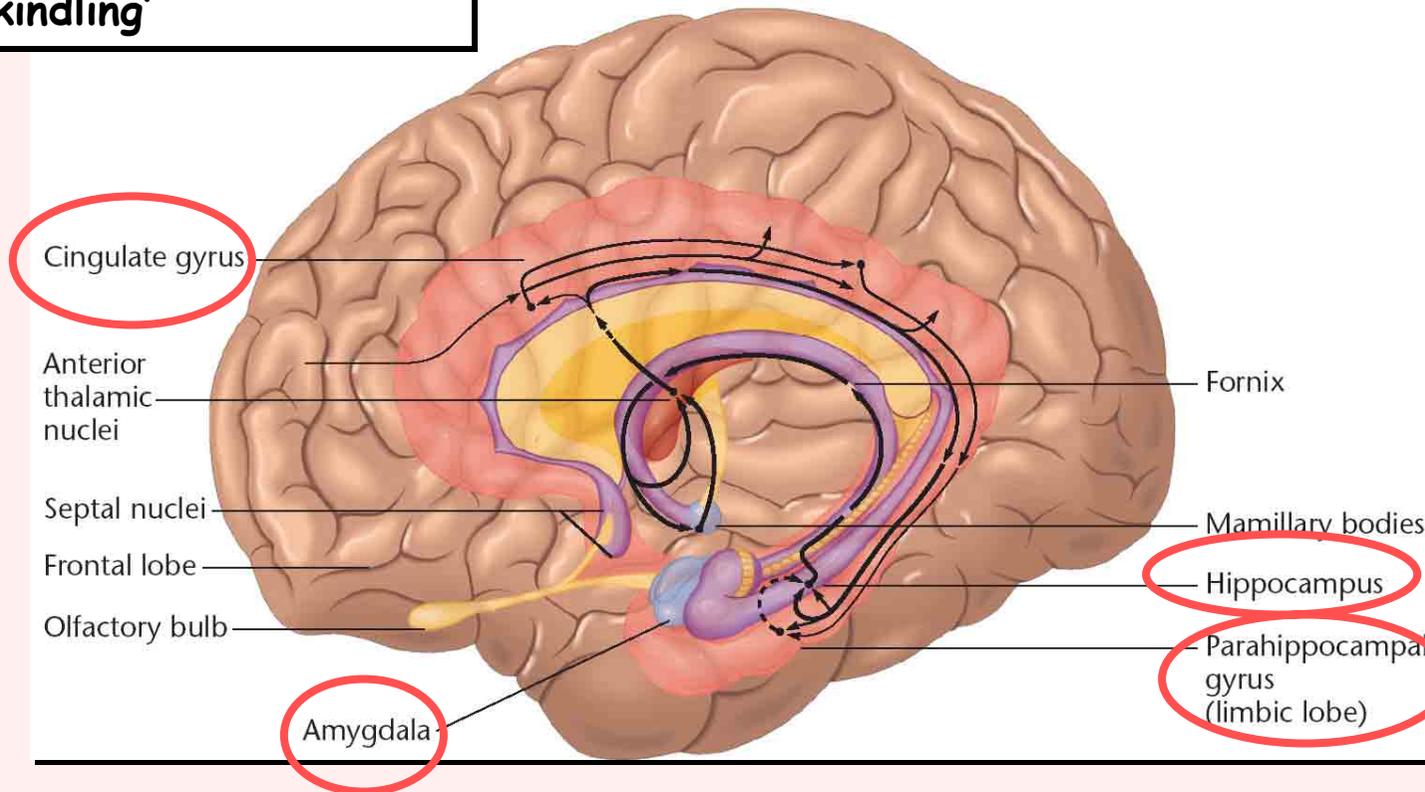
Modelo animal EP Parcial Compleja

- * Estimulación eléctrica **repetida** con intensidad **subumbral**
- * En regiones específicas del cerebro como la **amígdala**
- * Esto lleva a aumento **permanente** de la susceptibilidad a crisis EP

SISTEMA LÍMBICO

Sustrato anatómico

- EP parcial compleja
- 'kindling'



Una red de estructuras localizadas debajo de la corteza implicadas en el control de **emociones, afecto y memoria.**

'Kindling'

Unas 2 semanas luego de repetida estimulación sub-umbral los animales exhiben convulsiones al aplicarse la estimulación eléctrica

Sus cerebros se "sensibilizan" al estímulo sub-umbral!

El nombre viene del término inglés "encender" por la comparación de encender leña con pequeños tizones,

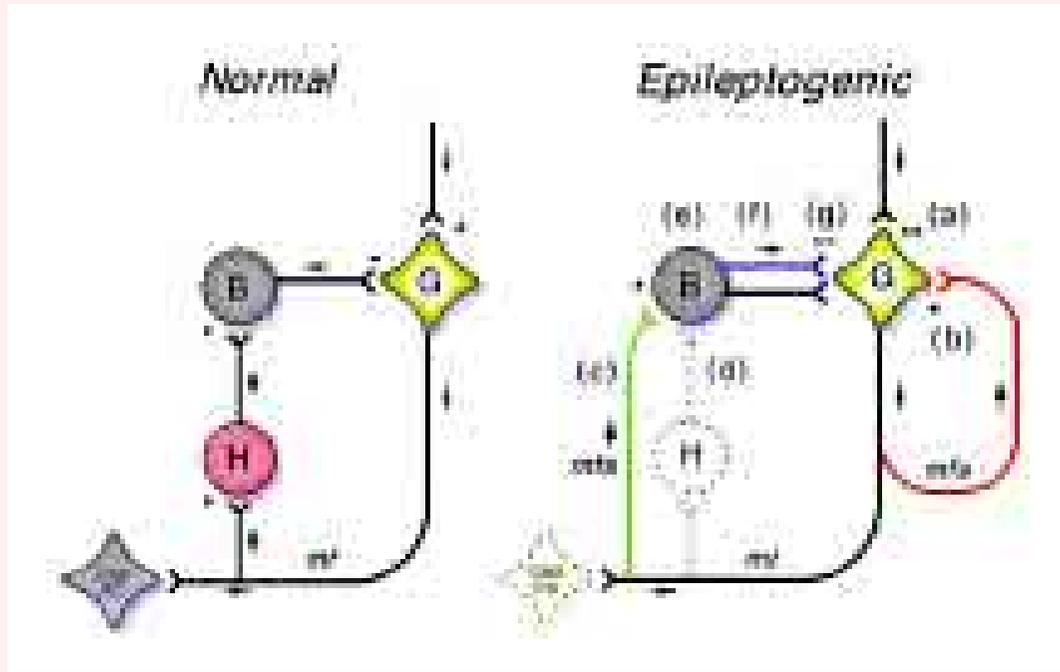
Es como "encender" el cerebro

La teoría detrás del kindling...

Pequeños eventos **repetidos** de estimulación aumentan la susceptibilidad para futuros episodios que finalmente pueden ocurrir espontáneamente

Algo pasa en el cerebro en el tiempo que aumenta la vulnerabilidad del sujeto para las crisis.

“Kindling” puede modificar “conexiones” del cerebro



Morimoto K. Progress in Neurobiology, 2004

- Crecimiento de nuevas conexiones.
- Pérdida de las conexiones existentes

En respuesta a **exceso de activación** neural (kindling) que lleva a alteración permanente de la susceptibilidad a las crisis

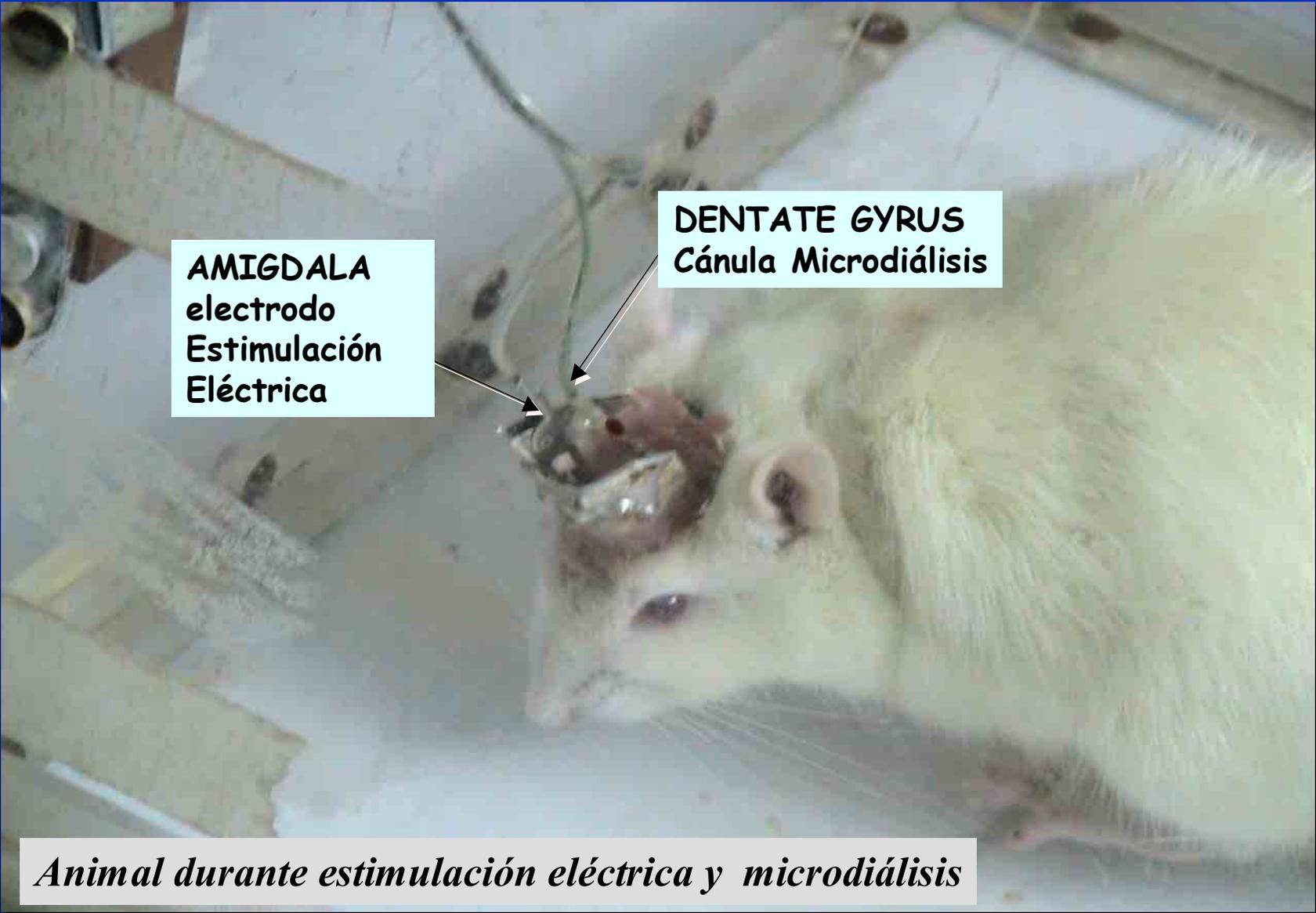
Epilepsia

Desbalance neuroquímico en el cerebro

Cambios en,

- * **Amino ácidos:** *GLU, GABA*
- * **Neuropéptidos:** *NPY o Galanina*
- * **Factores neurotróficos :** *BDNF*
- * **Citokinas**

Pueden inducir crisis epilépticas

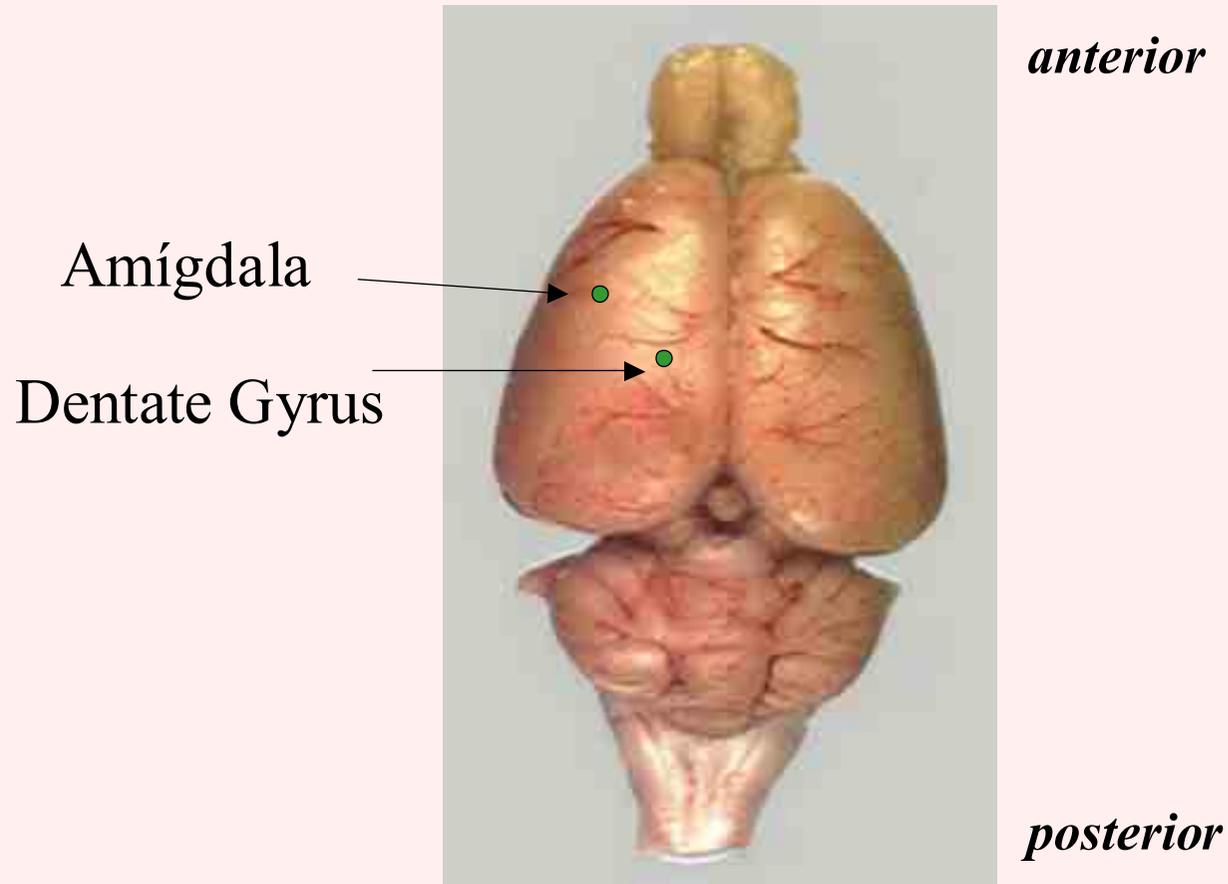


**AMIGDALA
electrodo
Estimulación
Eléctrica**

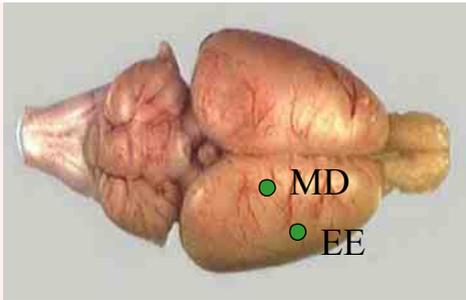
**DENTATE GYRUS
Cánula Microdiálisis**

Animal durante estimulación eléctrica y microdiálisis

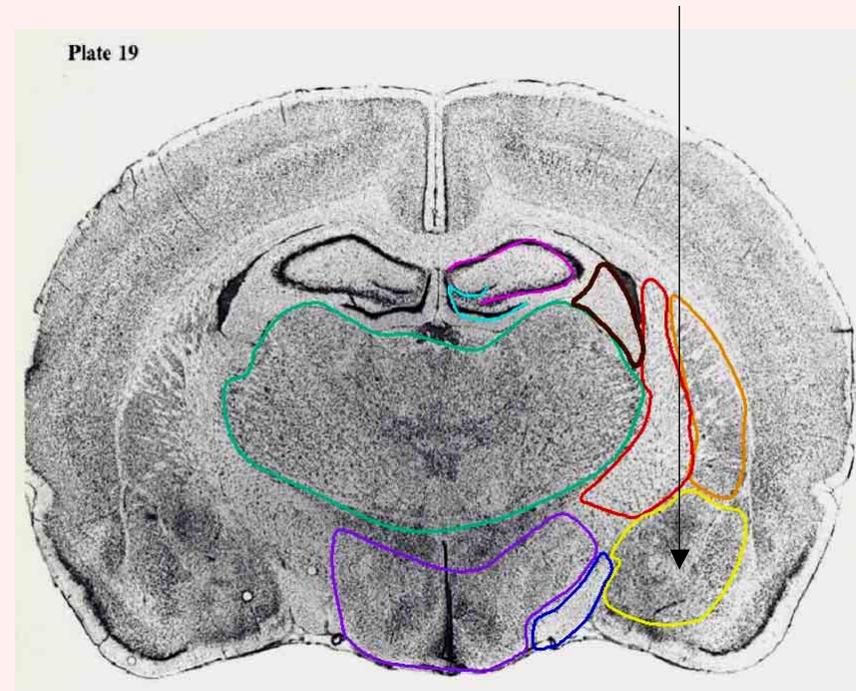
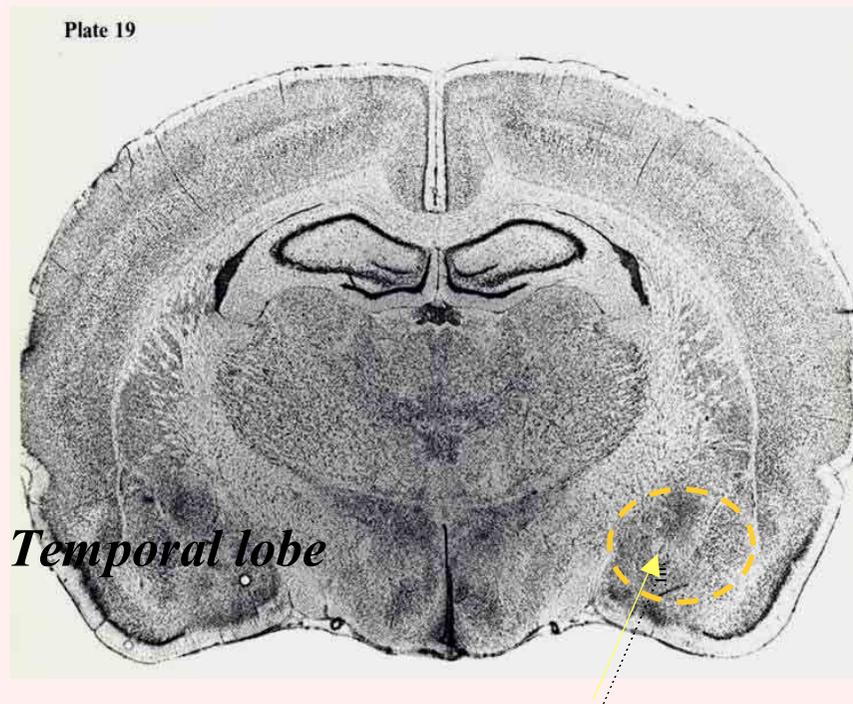
Microdiálisis en hipocampo durante *kindling* en amígdala



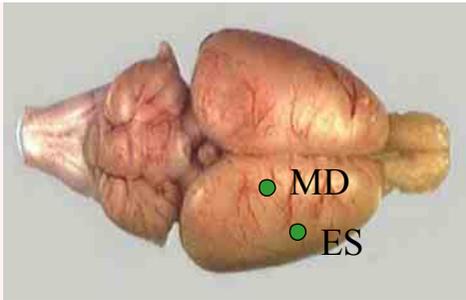
Cerebro de rata



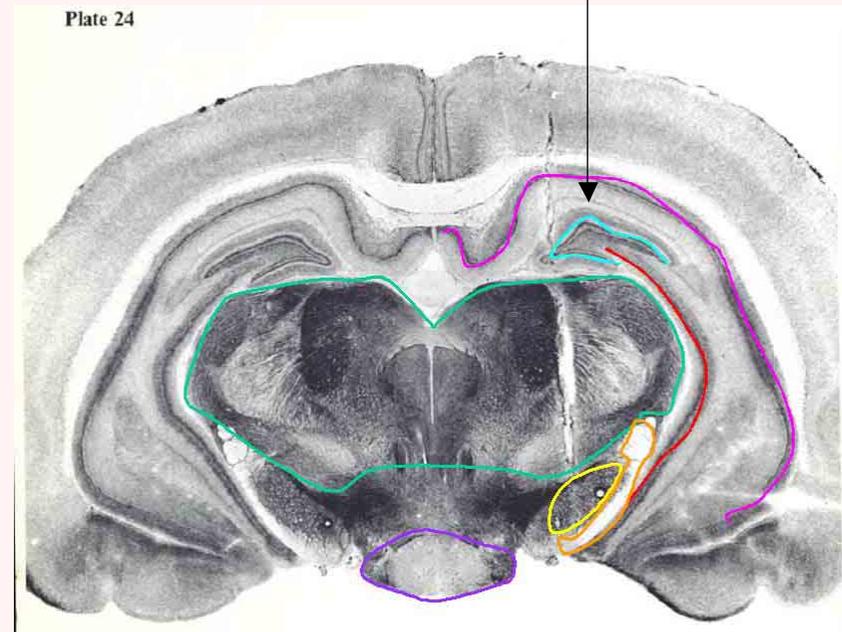
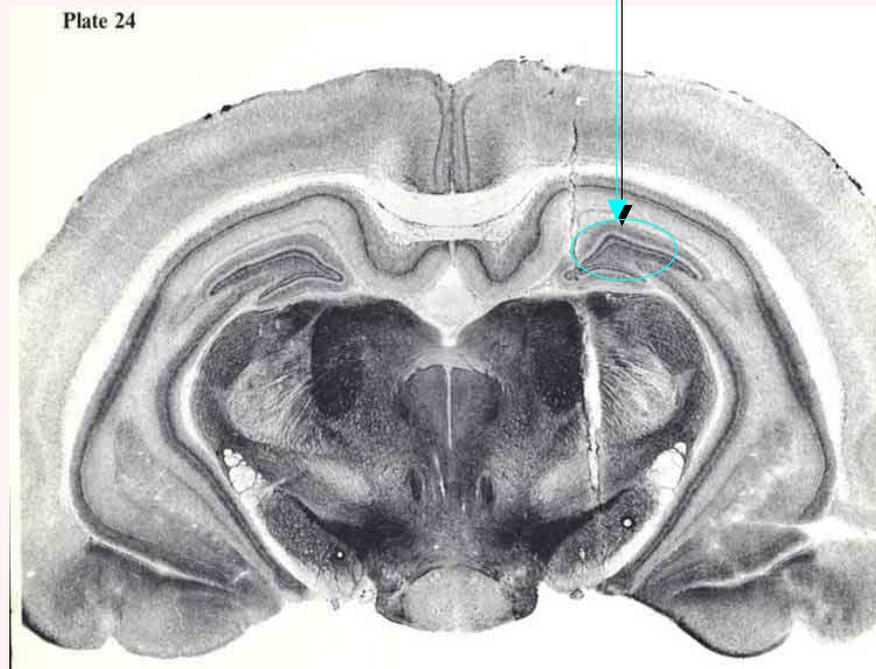
Estimulación Eléctrica “kindling” en AMÍGDALA



Cerebro rata AP: -3.4 mm bregma
L: 4.5 mm sagittal sinus



Microdiálisis DENTATE GYRUS (hippocampus)



Cerebro de rata AP: -4.5 mm bregma

L: 2.2 mm sagittal sinus

caudate
nucleus



caudate
nucleus



Hipocampo Dentate gyrus



astrocitos



microglia



neuronas



P. Rada Lab. Fisiología Conducta

Larisa Poluektova CNND Omaha 2005



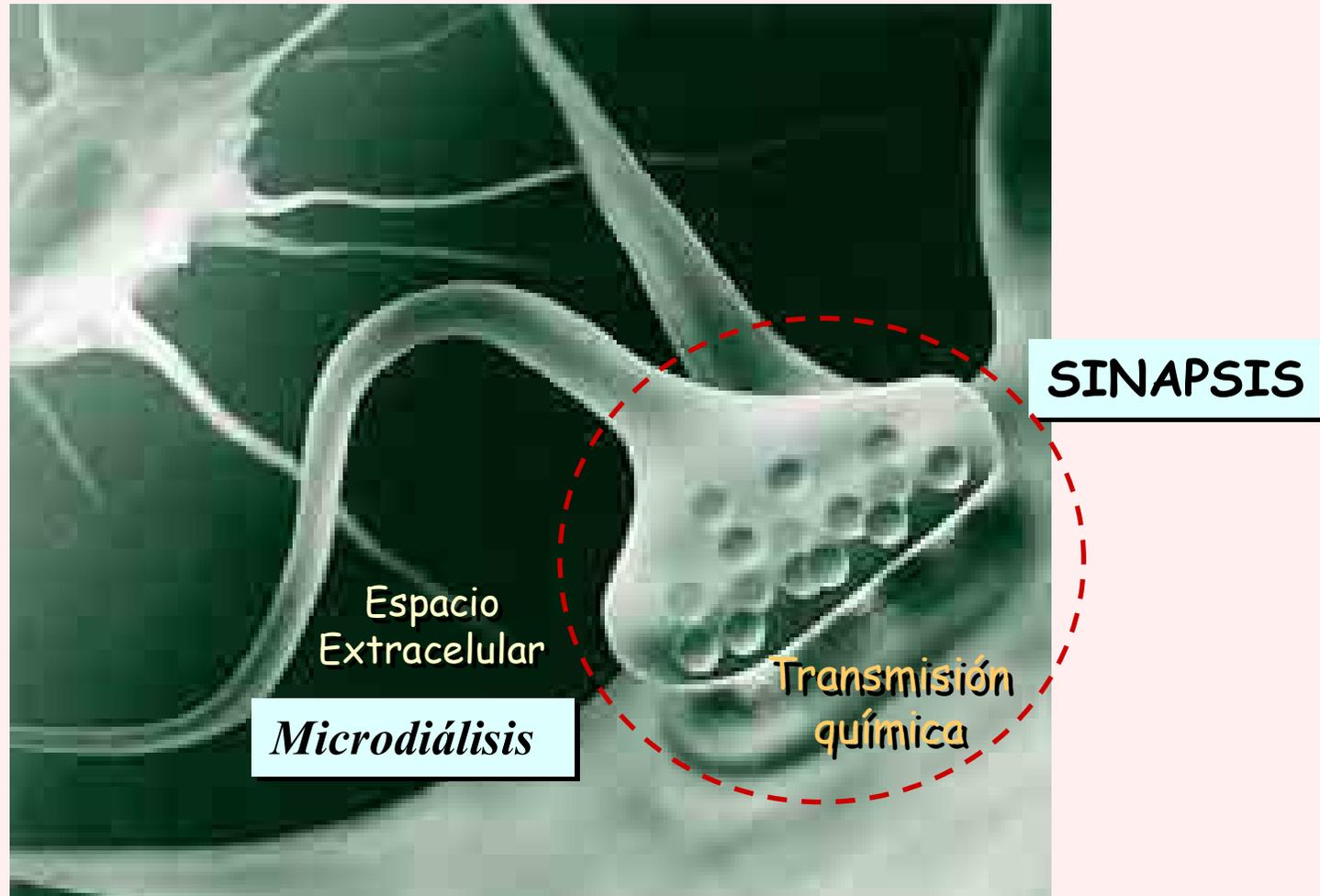
Hipocampo dentate gyrus ratas



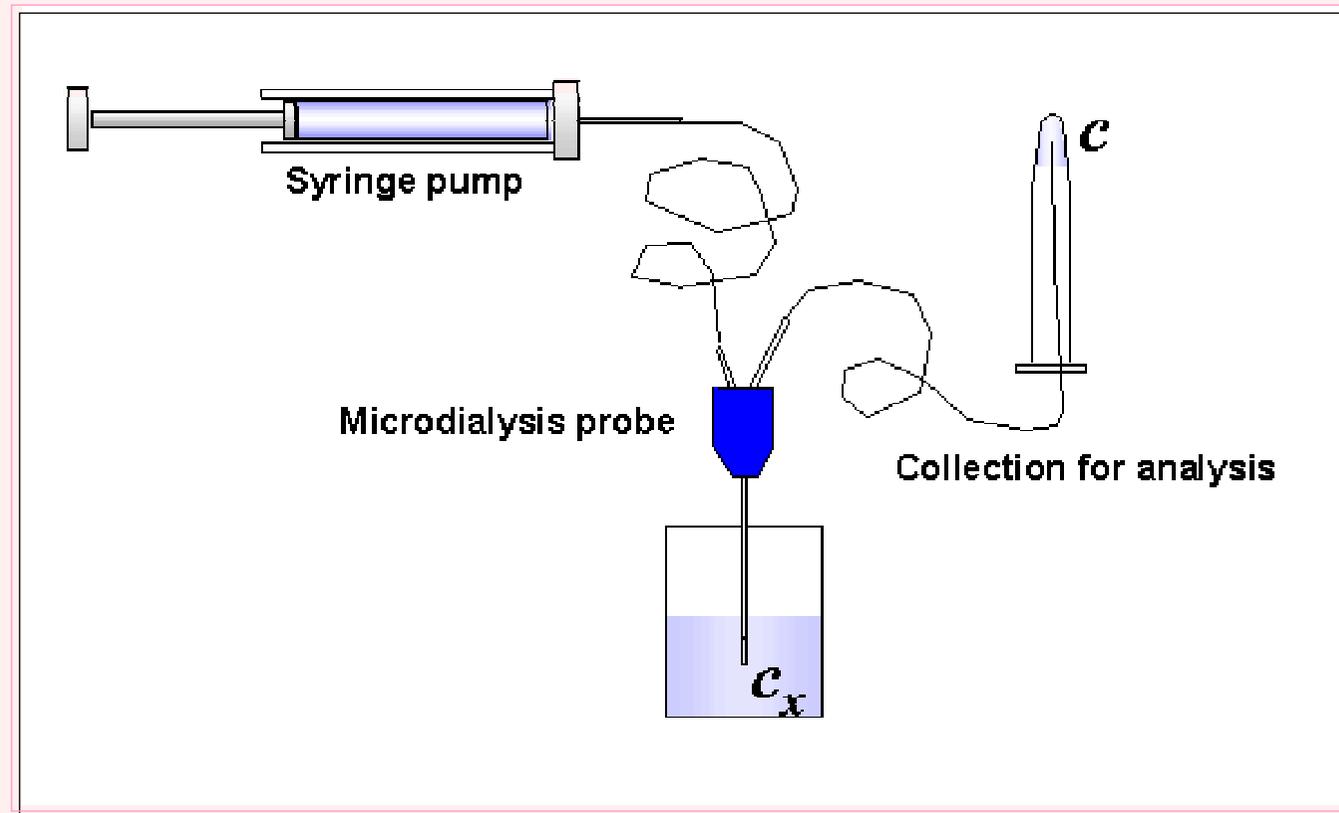
P. Rada Lab. Fisiología Conducta

Larisa.Poluektova CNND Omaha 2005

Microambiente bioquímico alrededor de sinapsis



Microdiálisis en movimiento...



Análisis de muestras

Mediciones de glutamato y otros

* **HPLC**

* **CE-LIFD**

alta sensibilidad,

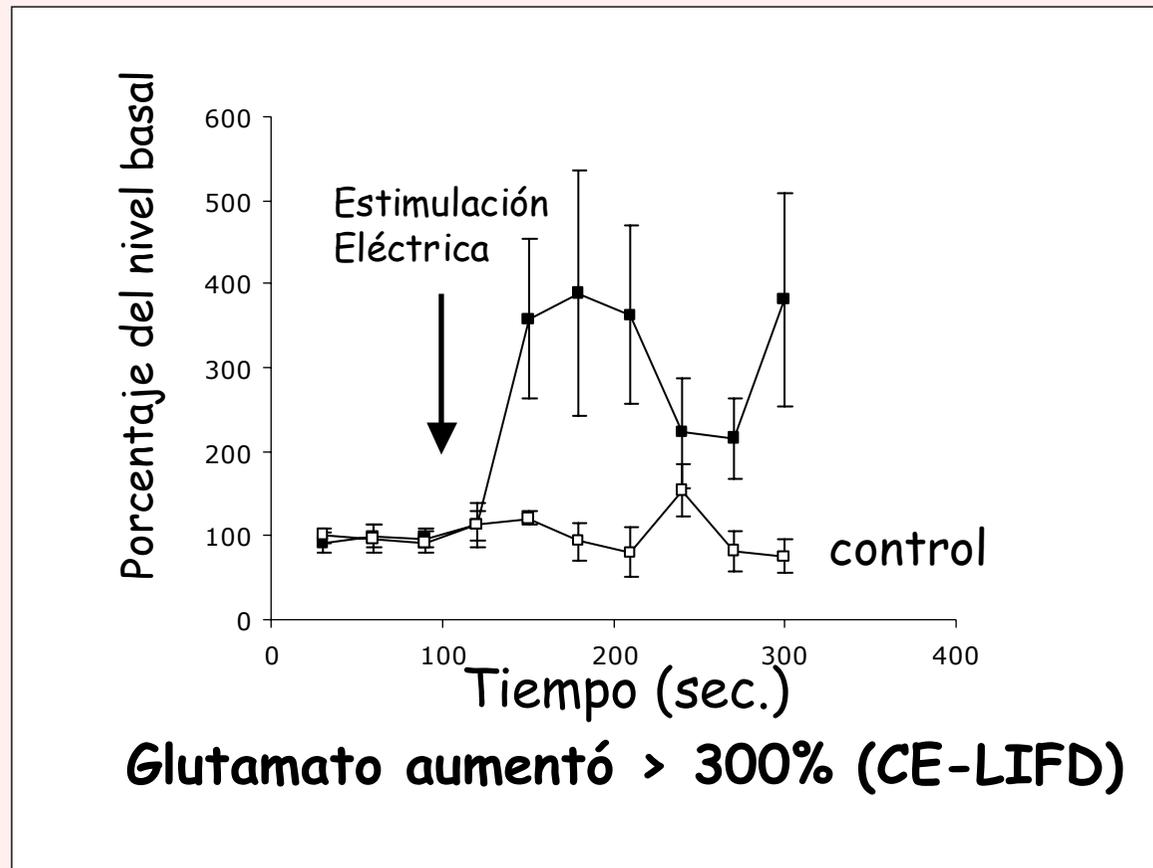
buena resolución

muy bajos volúmenes de muestras

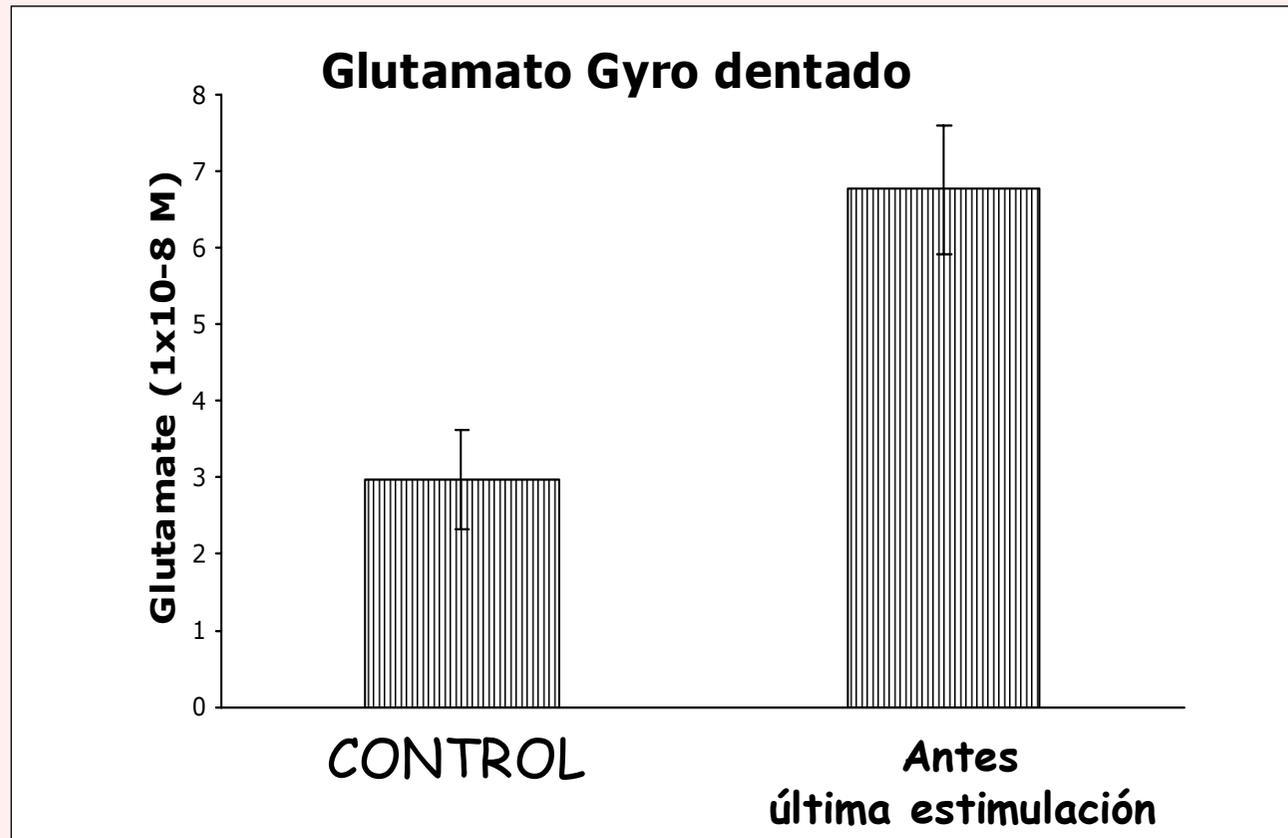
recolección en tiempos muy cortos !!

Primera microdiálisis hipocampo

2da sesión de estimulación eléctrica - No convulsiones



Segunda microdiálisis hipocampo 15ema estimulación eléctrica - Convulsiones



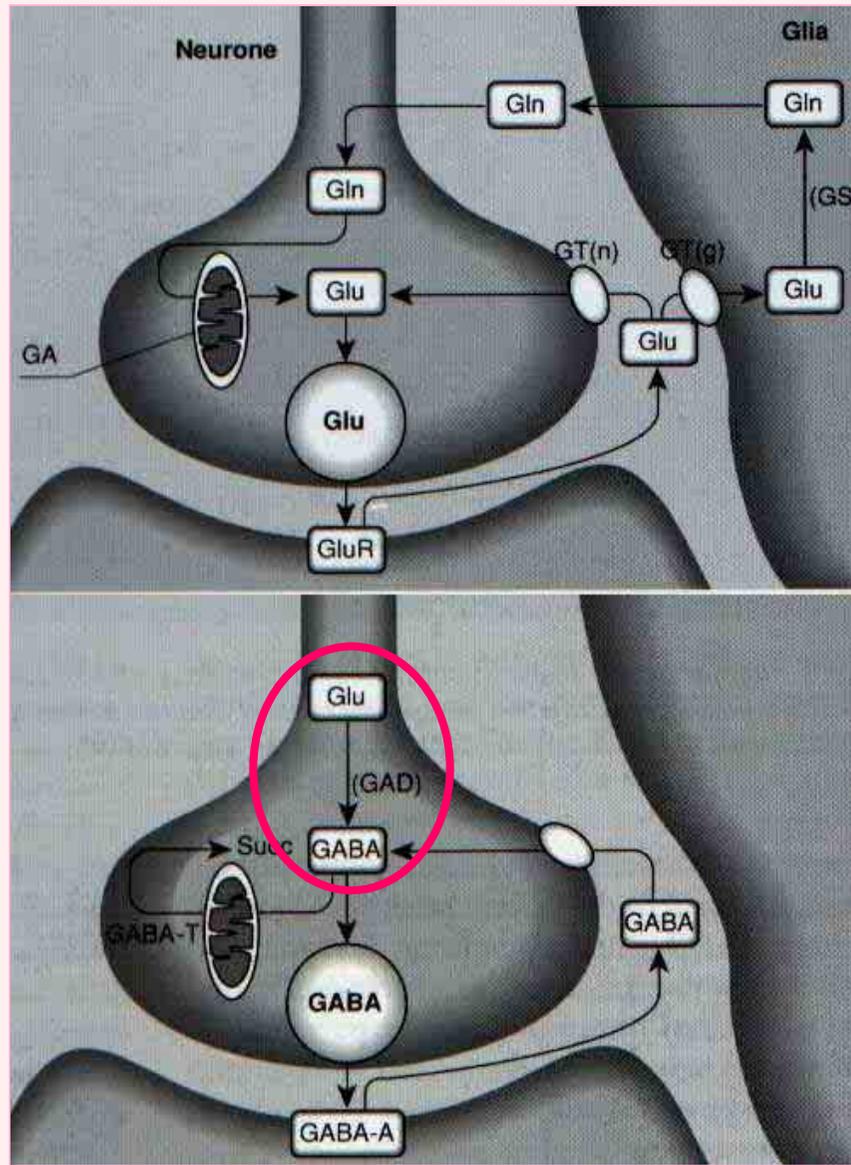
**Niveles basales de glutamato están ya aumentados
antes de la estimulación eléctrica**

Manipulación de Sistemas
Aminoacidérgicos
por
Transferencia Genética

En "kindling" en ratas
(modelo de EP compleja parcial)

Transgen enzima Glutamato descarboxilasa (GAD) en HSV1 amplicones

- Más GABA en hipocampo
- Modificación de "Kindling" y su correlato bioquímico ??



Sinapsis aminoacídérgicas

RESULTADOS esperados

- * Cambios de conducta
 - tests conductuales-
- * Cambios químicos:
 - microdiálisis y análisis de muestras-

Con respecto a los cambios ya conocidos durante "kindling"

TENDENCIAS EN TECNOLOGÍA TRANSFERENCIA GENÉTICA

1. Más aplicaciones pre clínicas y clínicas

Probar en más enfermedades mono, multigénicas y otras:

PD, ALS, epilepsia, diabetes, hipertensión, AR etc.

2. Optimización de vectores como "drogas"

Seguridad: inmunogenicidad de vectores

Prevención de replicación viral

Evitar agentes contaminantes

Prevención de mutagénesis insercional

Prevención de paso de ADN exógeno y viral a la línea germinal

Para el futuro.....

Expresión genética más eficientemente dirigida al blanco, para resolver más problemas médicos, sin causar daño a los pacientes, investigadores o ambiente!!!



Pero actualmente,

No podemos utilizar los vectores preparados fuera de Venezuela por regulaciones aduanales internacionales

Por tanto tenemos que **producir aquí** los vectores virales si queremos hacer algo de lo anterior

INFRAESTRUCTURA

PRODUCCIÓN DE VECTORES AMPLICONES

A. Cultivo de BACTERIAS E. Coli competentes

clonaje de secuencia genómica en plásmido amplicón
producción de plásmido amplicón

B. Cultivo de CÉLULAS

producción del amplicón: células BHK y TE CRE GRINA
titulación de los vectores: células GLI 36, E5, VERO

C. Producción de VECTORES AMPLICONES

FASE I: amplicones y helper virus
FASE II: amplicones

A

Laboratorio de BACTERIAS (clonaje)



**Centrífuga
refrigerada
maxipreparación**

**Campana de trabajo
con bacterias**



**Trabajo en la campana
cultivo de bacterias**

A

Laboratorio de BACTERIAS (clonaje)



Campana, nevera y mesón



Sonicador y centrífuga

A

Laboratorio de BACTERIAS (clonaje)

Incubador y agitador
crecimiento de
bacterias
(tubos y matraces)



B LABORATORIOS NIVEL 2 DE SEGURIDAD



B

LABORATORIOS NIVEL 2 DE SEGURIDAD

**GRUPO 2 DE RIESGO: riesgo individual moderado,
riesgo comunidad bajo**

- * Cualquier patógeno que **pueda causar enfermedad humana** en CN improbable que sea un peligro serio para trabajadores, comunidad, animales o el ambiente.
- * Exposiciones en el laboratorio rara vez causan infección que lleve a enfermedad grave
- * Debe haber **tratamiento efectivo y medidas preventivas disponibles**
- * El riesgo de diseminación es limitado

LABORATORIO NIVEL 2

- * Los riesgos de exposición primaria nivel 2 son a través de: **ingestión, inoculación y vía de entrada mucosa.**
- * Aunque los agentes nivel 2 no son transmitidos por vía aérea, **al generarse aerosoles** en los mesones pueden volverse un riesgo de ingestión por contaminación de manos o salpicaduras
- * Usar dispositivos de contención primaria como centrifugas con **rotores sellados o tapas de seguridad**
- * **Usar equipo apropiado de protección para el personal** (guantes, batas de laboratorio, protección de los ojos).
- * **Minimizar la contaminación ambiental** por el uso de lavamanos y dispositivos de descontaminación (**autoclaves**)

Laboratorio P2

CULTIVO DE CÉLULAS Y TRABAJO CON VECTORES

ambiente cerrado aire
acondicionado



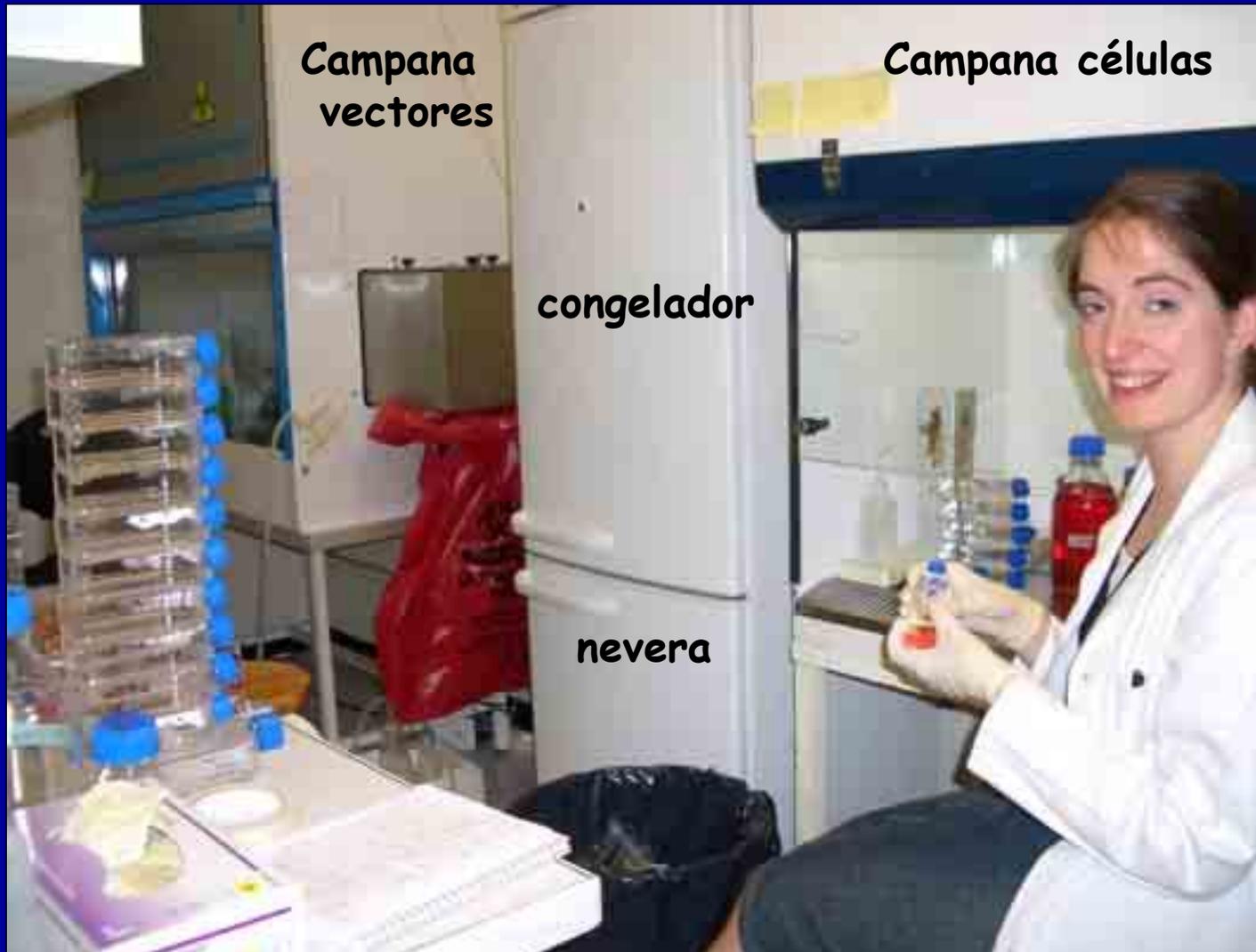
Laboratorio P2

2

Neveras a la entrada de cuartos
de FLUJO LAMINAR



Laboratorio P2



Campanas de flujo laminar separadas, para trabajo con vectores (fondo) para trabajo de cultivo de células (frente)

Laboratorio P2



CAMPANA para TRABAJO CON CÉLULAS

Laboratorio P2

CAMPANA TRABAJO CON CÉLULAS



Laboratorio P2

Campana células



Laboratorio P2



Campana antes de comenzar



Laboratorio P2

CAMPANA TRABAJO
CON VECTORES DESPUÉS
DE USO

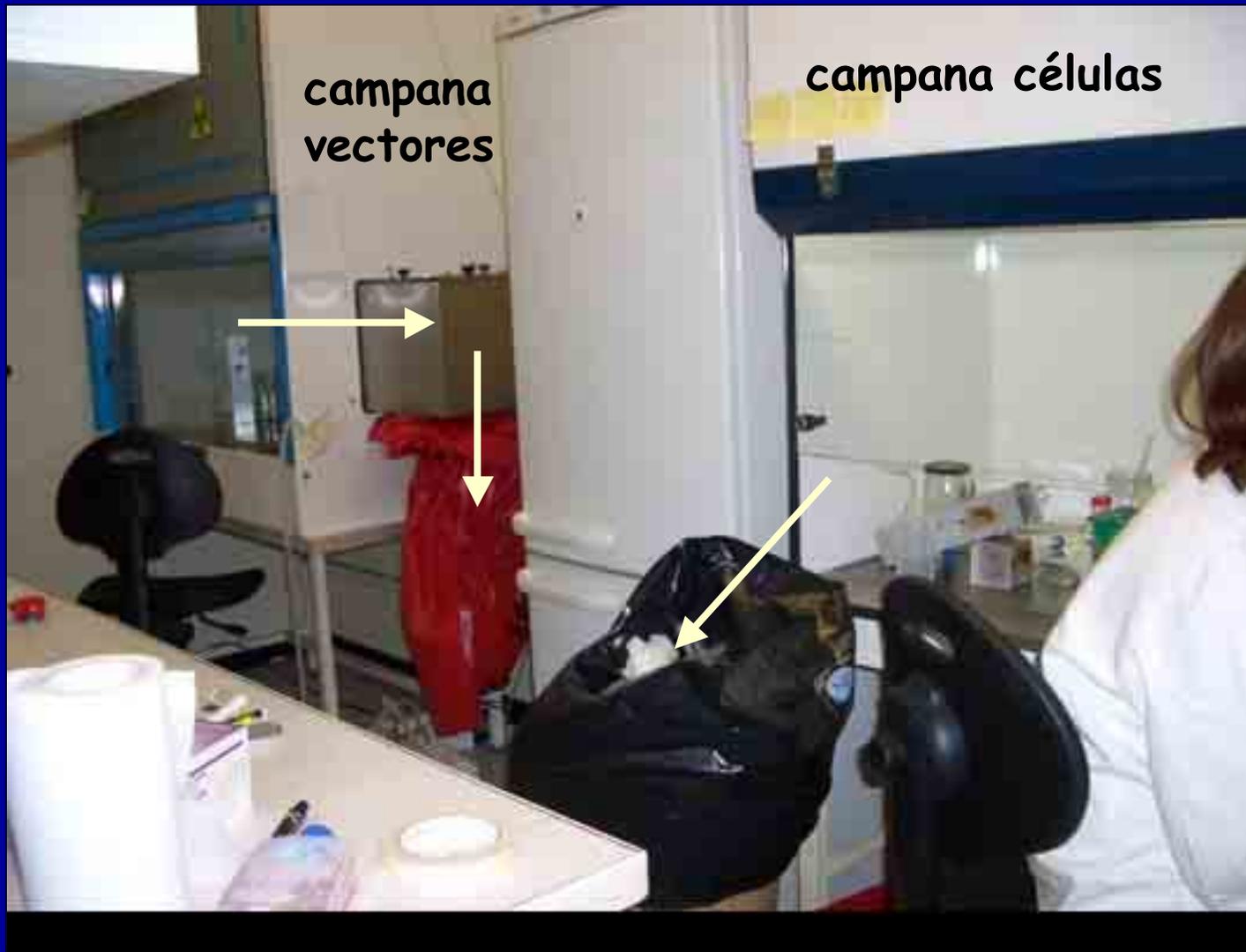
Área dentro de la
campana
para descartar material
contaminado con vectores
y virus



Laboratorio P2

Campana vectores





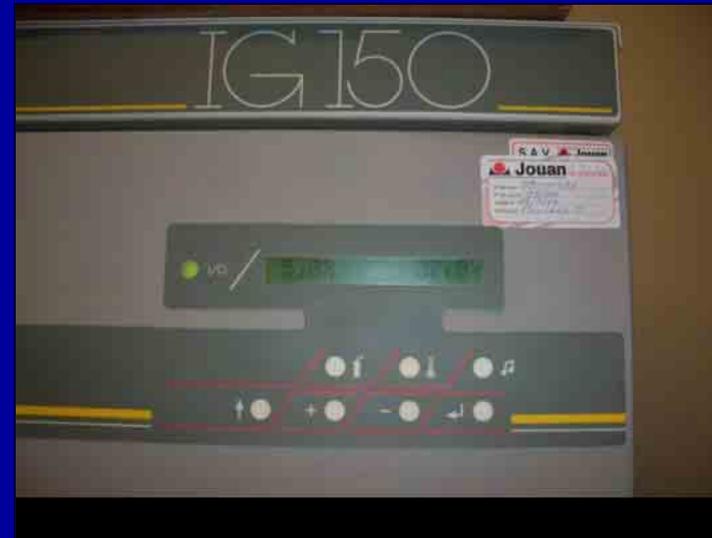
Eliminación de desechos en P2

Laboratorio P2



Incubador 37° C 5% CO2
Líneas celulares

Incubador 34° C 5% CO2
Células infectadas



Laboratorio P2

Material autoclavado



guantes



Pipetas y tubos cónicos



Laboratorio P2



Microscopio de inversión para ver células en cultivo

Laboratorio P2



**Sonicador para romper células y agitador
Protectores de ultrasonido**

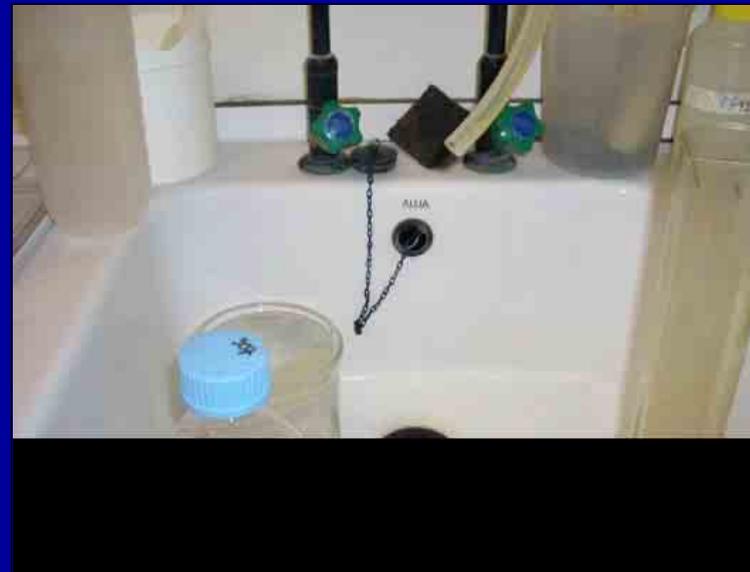


FREGADERO DE P2
Fuera de los laboratorios con flujo laminar



FREGADERO DE P2
Fuera de los laboratorios con flujo laminar

Recipientes desechables con hipoclorito de sodio antes de descartarlos





WATER BATH 37°C

FREGADERO DE P2
MATERIAL PARA DESCARTAR

CUARTO DE LIMPIEZA GENERAL

Material vidrio y plástico reusable



Autoclave



Laboratorio Biología Molecular



Laboratorio Biología Molecular



Laboratorio Biología Molecular



Laboratorio Biología Molecular



Laboratorio Biología Molecular



Cuarto frío a 4°C



Laboratorio Biología Molecular

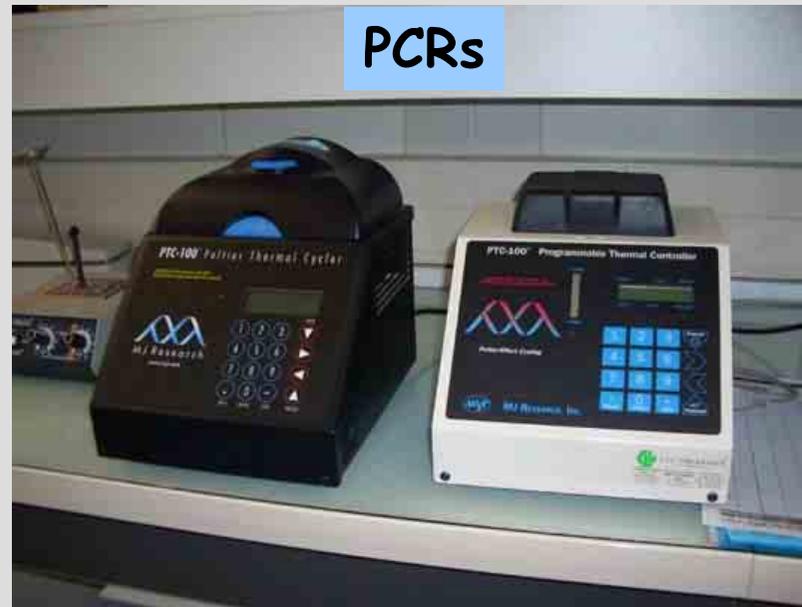
Centífuga refrigerada eppendorfs



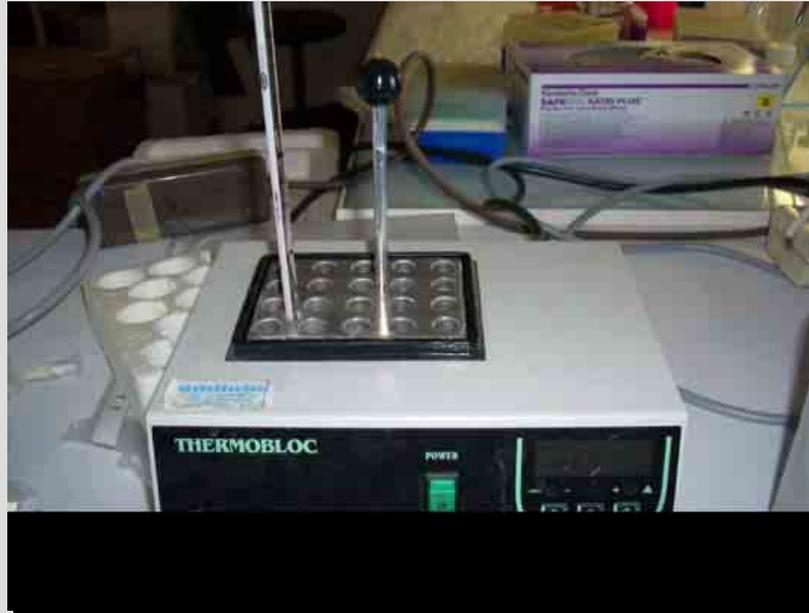
Centrífuga para eppendorfs minipreps



PCRs



Laboratorio Biología Molecular



Incubador diferentes temperaturas



Vortex, spinner

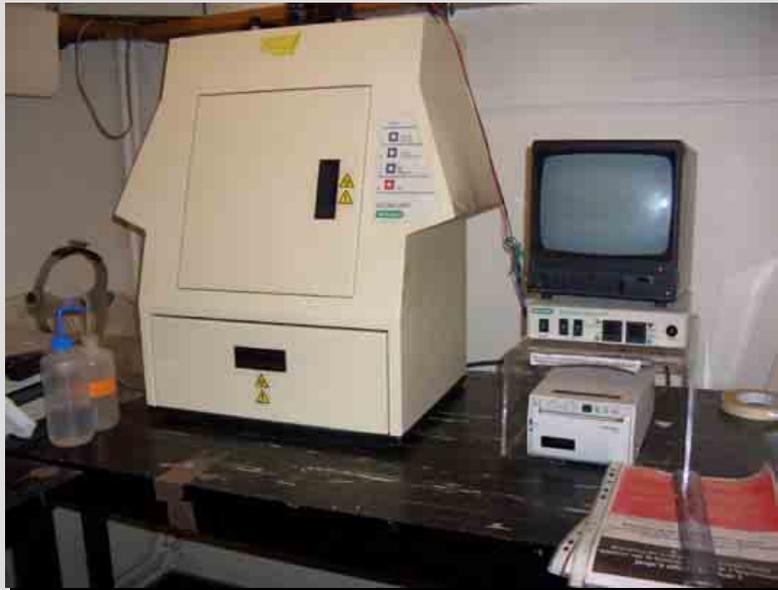
Laboratorio Biología Molecular



Electroforesis de geles
de agarosa



Laboratorio Biología Molecular



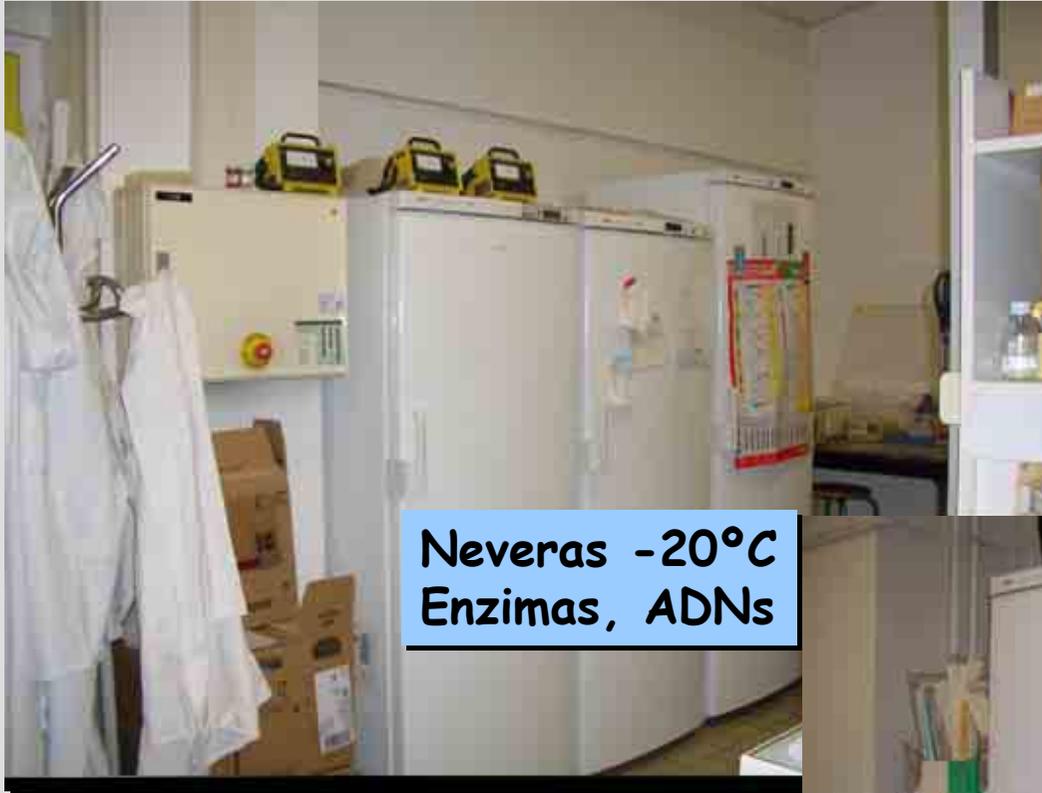
Transiluminación y fotografía
geles de agarosa



Laboratorio Biología Molecular



Baño 37°C digestiones



**Neveras -20°C
Enzimas, ADNs**

**Laboratorio
Biología Molecular
refrigeración**



**Congeladores -80°C
Vectores y virus**

Laboratorio Biología Molecular



Fregadero



Oficina
Escritorios, computadoras





¿Podremos hacerlo?

...??

