

**Título del proyecto:**

**Modificación del epigenoma: una nueva diana terapéutica para frenar la insulinitis en diabetes tipo 1.**

**Nombre del Investigador principal y que presentara el proyecto al Congreso:**

Izortze Santin Gomez.

**Institución:**

Instituto de Investigación Sanitaria BioCruces, Barakaldo, Bizkaia.

**Resumen del proyecto:**

En las etapas iniciales de la diabetes tipo 1 (DM1), los islotes pancreáticos son invadidos por linfocitos T que destruyen de manera específica las células responsables de la producción de insulina (célula  $\beta$  pancreática). Las células  $\beta$  pancreáticas participan activamente en la atracción de las células inmunes mediante la liberación de unas moléculas pro-inflamatorias llamadas quimiocinas, entre las que destaca la quimiocina CXCL10. Teóricamente, la migración de los linfocitos T hacia el islote pancreático se podría detener mediante la interrupción de la expresión y liberación de quimiocinas pro-inflamatorias que producen las propias células  $\beta$ .

Con la premisa de que la expresión de un gen se puede alterar modificando el nivel de metilación de su promotor (región reguladora), el objetivo principal de este proyecto es investigar el potencial uso de técnicas de edición epigenética (modificación de la metilación) para modular la expresión y liberación de la quimiocina CXCL10 en célula  $\beta$  y detener su contribución en la progresión de la insulinitis. Para editar la metilación de CXCL10, se usará una variante de la técnica CRISPR-Cas mediante la cual se puede dirigir de manera específica una enzima llamada metilasa (proteína responsable de la metilación) a la zona del genoma que se desea modificar.

Los resultados derivados del presente proyecto abrirán la puerta al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para detener la insulinitis y prevenir la destrucción de la célula  $\beta$ , basadas en la modificación epigenética de mediadores inflamatorios. Si la interrupción de la liberación de CXCL10 por parte de las células  $\beta$  tuviera un impacto en el desarrollo de la insulinitis y en consecuencia en el desarrollo de la DM1, la edición epigenética podría servir como estrategia terapéutica para prevenir la destrucción de la célula  $\beta$  en individuos con riesgo a padecer la enfermedad (HLA de riesgo y presencia de autoanticuerpos).

## **I. Grupo de Investigación**

### **a. Descripción y trayectoria del Grupo de Investigación**

El Grupo de Investigación en Genética y Control de Diabetes y Enfermedades Endocrinas dirigido por el Dr. Luis Castaño se localiza en el Centro de Investigación Biosanitaria BioCruces (Barakaldo, Bizkaia). El Grupo está compuesto por investigadores básicos y clínicos cuyo trabajo se centra en el análisis genético-molecular de diversas enfermedades endocrinas, entre las que se incluye la DM1. A nivel nacional está integrado en el Ciber de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) y en el Ciber de Enfermedades raras (CIBERER) del ISCIII. A nivel internacional, el Grupo participa en diferentes redes de investigación, como el European Type 1 Diabetes Genetic Network (ET1DGN) o el Hvidovre Study Group for Childhood Diabetes.

Las actividades científicas del Grupo están relacionadas con el estudio de los mecanismos genéticos implicados en el desarrollo de las enfermedades endocrinas y metabólicas (diabetes), así como en la prevención y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (inmunomodulación y/o terapia celular) para mejorar el control de las mismas. En este sentido, estudia los determinantes genéticos de susceptibilidad de la diabetes autoinmune y los marcadores inmunológicos de diagnóstico precoz, y en el ámbito de la prevención, está participando en ensayos clínicos internacionales encaminados a la inducción de tolerancia inmune con autoantígenos frente a la DM1, como el estudio TRIGR (Trial to Prevent IDDM in Genetically at Risk Children) o el estudio Diamyd (ensayo clínico con anticuerpos anti-GAD).

La Dra. Santin (investigadora principal del presente proyecto), se unió al Grupo en 2013 para abrir una nueva línea de investigación centrada en la caracterización de los mecanismos genético-moleculares que subyacen a la destrucción de la célula  $\beta$  pancreática en DM1. Aunque la Dra. Santin es una investigadora relativamente joven, su trayectoria avala su experiencia en el estudio de la genética y fisiopatología de la DM1. Durante su formación predoctoral en la Unidad de Investigación del Hospital de Cruces, se centró en el estudio de la genética de enfermedades autoinmunes, concretamente la diabetes tipo 1 y la enfermedad celíaca. En esta etapa, la Dra. Santin se especializó en la realización de estudios de asociación genética y análisis de expresión de genes candidato en muestras humanas. Durante su formación postdoctoral en la Universidad Libre de Bruselas, la Dra. Santin trabajó con modelos *in vitro* de célula  $\beta$  pancreática y modelos *in vivo* de DM1 y se centró en la caracterización del impacto funcional a nivel de célula  $\beta$  pancreática de los genes asociados con DM1.

### **b. Publicaciones del Grupo**

En los últimos años el Grupo de Investigación en Genética y Control de Diabetes y Enfermedades Endocrinas dirigido por el Dr. Luis Castaño ha participado en diversos **proyectos y consorcios internacionales** para el estudio de la DM1. A continuación se enumeran tres publicaciones derivadas de dichas colaboraciones:

1. Nucci AM, Virtanen SM, Sorkio S, Bärlund S, Cuthbertson D, Uusitalo U, Lawson ML, Salonen M, Berseth CL, Ormiston A, Lehtonen E, Savilahti E, Becker DJ, Dupré J, Krischer JP, Knip M, Åkerblom HK; TRIGR Investigators (Luis Castaño). Regional differences in milk and complementary feeding patterns in infants participating in an international nutritional type 1 diabetes prevention trial. *Matern Child Nutr* 2016 (epub ahead of print).
2. Cabrera SM, Wang X, Chen YG, Jia S, Kaldunski ML, Greenbaum CJ; Type 1 Diabetes TrialNet (Luis Castaño), Canakinumab Study Group, Mandrup-Poulsen T; AIDA Study Group, Hessner MJ. Interleukin-1 antagonism moderates the inflammatory state associated with Type 1 diabetes during clinical trials conducted at disease onset. *Eur J Immunol* 46:1030-46, 2016.
3. Kaur S, Mirza AH, Brorsson CA, Fløyel T, Størling J, Mortensen HB, Pociot F; Hvidoere International Study Group (Luis Castaño). The genetic and regulatory architecture of ERBB3-type 1 diabetes susceptibility locus. *Mol Cell Endocrinol* 419: 83-91, 2016.

Además, dentro la **línea de investigación propia de la Investigadora Principal del presente proyecto** se encuadran las siguientes dos publicaciones:

1. I. Santin, DL. Eizirik. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and  $\beta$  cell apoptosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15: 71-81, 2013.
2. I. Santin, F. Moore, ML. Colli, EN. Gurzov, L. Marselli, P. Marchetti, DL. Eizirik. PTPN2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Pancreatic B Cell Apoptosis via Regulation of the BH3-Only Protein Bim. *Diabetes* 60:3279-88, 2011.

### c. Equipo de trabajo para la realización del proyecto

Para la realización del presente proyecto, la Dra. Santin contará con la colaboración de la investigadora predoctoral Teresa Velayos, y la investigadora postdoctoral Danika Schepnis.

La Dra. **Izortze Santin** ha mantenido una trayectoria destacada en el estudio de los aspectos genéticos y moleculares de la etiopatogenia de la DM1. Ha estado implicada como investigadora colaboradora en diversos proyectos nacionales e internacionales centrados en la genética de la diabetes, así como en el diseño de nuevas terapias para proteger las células productoras de insulina de su destrucción en DM1. Entre los proyectos internacionales en los que ha participado cabe destacar el Proyecto NAIMIT de la Comisión Europea-FP7, en el que participó como investigadora colaboradora mediante el estudio del impacto de ciertos genes candidato para DM1 en la comunicación entre las células  $\beta$  y las células del sistema inmune.

**Teresa Velayos** es Licenciada en Bioquímica y desde 2013 pertenece al Grupo de Investigación en Genética y Control de Diabetes y Enfermedades Endocrinas (Instituto BioCruces). Su investigación se ha centrado en la búsqueda de genes responsables de las diferentes formas de diabetes monogénicas y en la caracterización funcional de los genes etiológicos en modelos *in vitro* de célula  $\beta$ .

**Danika Schepnis** es Dra. en Inmunología por la Universidad de Karolinska (Suecia) y se unió al Grupo a finales de 2015 para desarrollar un proyecto de investigación centrado en la caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos T de pacientes con DM1. La Dra. Schepnis es experta en el aislamiento y cultivo de células del sistema inmune y tiene una amplia experiencia en la realización de estudios inmunológicos.

#### d. Facilidades y medios para la realización del proyecto

En lo que a infraestructura se refiere, el Instituto de Investigación Biosanitaria BioCruces cuenta con las instalaciones necesario para la realización del proyecto: laboratorios de biología molecular, salas de cultivo y despachos.

Entre la tecnología disponible en el Centro se encuentra todo lo necesario para llevar adelante este proyecto:

- Equipamiento general de laboratorio: vortexes, balanzas, centrifugas, termo-bloques, pipetas, etc.
- Salas de cultivo: cabinas de flujo laminar, incubadores de CO<sub>2</sub>, microscopios, etc.
- Campanas de bioseguridad nivel C2.
- Espectrofotómetro para la cuantificación de ácidos nucleicos.
- Neveras y congeladores (4°C, -20°C and -80°C).
- Termocicladores (estándar y de gradiente).
- PCR a tiempo: ABI7900 (Applied Biosystems) y Eco RT-PCR (Illumina) para estudios de expresión.
- Lector de microplacas para fluorescencia, luminiscencia y absorbancia.
- Pirosecuenciador.
- Citometro de flujo.

Cabe destacar que el Instituto BioCruces cuenta con varias plataformas tecnológicas que serán de gran ayuda para la consecución de este proyecto. El Instituto cuenta con una Unidad de Genética y Genómica donde se realizan diversas técnicas de interés para el presente proyecto: análisis de expresión génica y análisis de metilación, entre otras. Además, el Instituto cuenta con una Unidad de Citometría de Flujo que se encarga del uso, mantenimiento y puesta a punto de los equipos y también proporciona asesoramiento en la preparación de la muestra, análisis, diseño y puesta a punto experimental. Ambas plataformas cuentan con la tecnología necesaria para la realización de diversas técnicas y también con el equipo humano para la ejecución de las mismas.

Finalmente, en lo que se refiere a las líneas celulares necesarias para la realización del presente proyecto, actualmente el Grupo tiene en marcha la línea de célula  $\beta$  pancreática humana EndoC- $\beta$ H1 (amablemente cedida por el Prof. Scharfmann, Universidad de Paris, Francia)<sup>1</sup>. Cabe destacar que para el presente proyecto no se prevé el uso de muestras de origen humano ni de animales de experimentación, por lo tanto no es necesaria la aprobación del Comité de Ética para la ejecución del mismo.

## **II. Proyecto de investigación:**

### **Introducción**

#### **a. Objetivo general:**

El objetivo general de este proyecto es investigar el potencial uso de técnicas de edición epigenética (modificación de la metilación) para modular la expresión de la quimiocina CXCL10 en célula  $\beta$  y detener su contribución en la progresión de la insulinitis.

#### **b. Estado actual del tema:**

La diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad crónica en la que las células del sistema inmune destruyen de manera específica las células responsables de producir insulina en el páncreas (células  $\beta$  pancreáticas). En las etapas iniciales de la enfermedad, las células del sistema inmune (principalmente linfocitos T) infiltran el islote pancreático y liberan unas sustancias llamadas citocinas (sobre todo IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ ) que contribuyen a crear un ambiente pro-inflamatorio (insulinitis) en el islote pancreático <sup>2</sup>. Esas sustancias pro-inflamatorias son reconocidas por las células  $\beta$  mediante receptores que tienen en su superficie e inducen por un lado, la activación de la muerte programada (o apoptosis) de la propia célula  $\beta$ , y por otro, la liberación de sustancias pro-inflamatorias (o quimiocinas) que contribuyen a la atracción de más células del sistema inmune, aumentando la insulinitis y en consecuencia, la destrucción de las células  $\beta$  <sup>2</sup>.

Debido a la dificultad de obtener tejido pancreático de personas con DM1, la insulinitis es un fenómeno poco caracterizado en humanos y la mayoría de los estudios se han realizado en modelos animales. Estos estudios han descrito una relación directa entre la aparición de la insulinitis y la progresión de la enfermedad <sup>2-3</sup>. De hecho, en ratones en los que se induce la aparición de diabetes con una droga llamada estreptozotocina, se ha visto que la aparición de diabetes está precedida por la producción de quimiocinas pro-inflamatorias (CXCL10, entre otras) por parte de las células  $\beta$  <sup>4</sup>. En humanos, se ha observado que pacientes con DM1 e individuos sanos con riesgo a desarrollar DM1, tiene niveles elevados de CXCL10 en suero <sup>5</sup>. Además, estudios en islotes de diabéticos han demostrado que la expresión CXCL10 está aumentada y que los linfocitos T que infiltran el islote expresan el receptor que reconoce CXCL10 (denominado CXCR3) <sup>6</sup>. Por ello, se sabe que CXCL10 juega un papel fundamental en la atracción de linfocitos T al islote pancreático.

Mediante el análisis de marcadores inmunológicos y genéticos, la DM1 se puede predecir meses e incluso años antes de su aparición <sup>7</sup>, por ello el desarrollo de terapias que interrumpan el proceso autoinmune en personas con riesgo alto de desarrollar la enfermedad sería de gran valor para la prevención de la misma. Teóricamente, la migración de linfocitos T al islote pancreático (proceso que sucede meses / años antes de que haya una destrucción significativa de célula  $\beta$ ) se podría detener mediante la supresión de la expresión de quimiocinas pro-inflamatorias. Por ello, la interrupción de la expresión de quimiocinas pro-inflamatorias se ha erigido como una potencial diana terapéutica para evitar la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ . Así, el bloqueo de la interacción entre CXCL10 y su receptor CXCR3 evita el desarrollo de la insulinitis en modelos animales de diabetes autoinmune <sup>8</sup>, y el uso de vacunas de ADN de CXCL10 previene el desarrollo espontáneo de la enfermedad en el ratón NOD (modelo animal de DM1) <sup>9</sup>. Aunque estos resultados son prometedores, la incapacidad de desarrollar estrategias que interrumpan este proceso de manera local (específicamente en célula  $\beta$ ), ha limitado el potencial terapéutico de los mismos.

La expresión de los genes que codifican CXCL10 y otras quimiocinas pro-inflamatorias está regulada por diferentes mecanismos, entre los que se incluye un proceso epigenético llamado metilación. En general, cuando las regiones promotoras de un gen están metiladas, la expresión de ese gen está reprimida, y cuando están desmetiladas, se activa la expresión. Así, mediante la modificación de la metilación del promotor de un gen se puede activar o reprimir su expresión. Diversos estudios han usado fármacos para modificar de manera satisfactoria la expresión de quimiocinas <sup>10</sup>, sin embargo el uso de estos fármacos tiene limitaciones, ya que afectan a la metilación global del genoma.

Mediante una variante de la técnica CRISPR-Cas, es posible dirigir a una región concreta del genoma una metilasa (proteína responsable de la metilación) y modificar la metilación de esa región de manera específica <sup>11</sup>. Teniendo como premisa que la expresión de los genes se puede alterar mediante la modificación de la metilación, este proyecto tiene como objetivo principal interrumpir mediante edición epigenética la expresión y liberación de CXCL10 por parte de las células  $\beta$  para detener la migración de linfocitos T al islote pancreático (insulinitis) y así, prevenir la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ .

Los resultados derivados del presente proyecto abrirán la puerta al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para detener la insulinitis y prevenir la destrucción de la célula  $\beta$ , basadas en la modificación epigenética de mediadores inflamatorios. La posibilidad de interrumpir la atracción de los linfocitos T al islote pancreático antes del inicio de la destrucción de célula  $\beta$  supondría un avance importante en la prevención de la enfermedad.

#### c. Novedad del proyecto:

La principal novedad del presente proyecto es la utilización de técnicas de edición epigenética para inhibir la expresión y liberación de una quimiocina pro-inflamatoria (CXCL10) que juega un papel fundamental en el desarrollo de la insulinitis en DM1. Si bien son muchos los estudios que han intentado inhibir la expresión de CXCL10 con el mismo objetivo (detener la insulinitis), estos trabajos se han centrado en el uso de fármacos, anticuerpos o vacunas que no actúan de manera específica en las células  $\beta$  y que por tanto tienen efectos no específicos que suponen un inconveniente para su uso terapéutico <sup>12-13</sup>.

El uso de la edición epigenética permitiría modificar la metilación de la región promotora de CXCL10 de manera específica sin afectar al nivel de metilación global del genoma.

### **Objetivos específicos y desarrollo del proyecto**

#### a. Objetivos específicos:

Para alcanzar el objetivo principal del presente proyecto, se han establecido los siguientes objetivos específicos que responderán a las siguientes preguntas:

**1.** Analizar los patrones de expresión y metilación de CXCL10 en célula  $\beta$  pancreática tras la exposición a estímulos pro-inflamatorios.

**PREGUNTAS:** ¿El tratamiento con citocinas pro-inflamatorias provoca cambios en la expresión y metilación de CXCL10? ¿Están los cambios en la expresión y la metilación correlacionados?

2. Modificar la expresión y liberación de CXCL10 por parte de las células  $\beta$  mediante el uso de edición epigenética.

*PREGUNTA: ¿Podemos cambiar la expresión y liberación de CXCL10 modificando el grado de metilación de su promotor de manera específica mediante edición epigenética?*

3. Determinar si la modificación de la expresión de CXCL10 mediante edición epigenética evita la migración de las células inmunes hacia las células  $\beta$ .

*PREGUNTA: ¿La interrupción de la liberación de CXCL10 por parte de las células  $\beta$  evita o disminuye la migración de los linfocitos T?*

### **Bibliografía**

1. Ravassard, P. *et al.* A genetically engineered human pancreatic  $\beta$  cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 121, 3589–97 (2011).
2. Eizirik, DL. *et al.* The role of inflammation in insulinitis and  $\beta$ -cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 5, 219-26 (2009).
3. Campbell-Thompson, M. *et al.* Insulinitis and  $\beta$ -cell mass in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 65, 719–731 (2016).
4. Burke, SJ. *et al.* Pancreatic  $\beta$ -Cell production of CXCR3 ligands precedes diabetes onset. *BioFactors* 42, 703-715 (2016).
5. Shimada, A. *et al.* Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24, 510–515 (2001).
6. Uno, S. *et al.* Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocr J* 57: 991-6, 2010.
7. Atkinson, MA. *et al.* Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221–229 (2001).
8. Christen, U. *et al.* Among CXCR3 chemokines, IFN- $\gamma$ -inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL10)) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J Immunol* 171, 6838–6845 (2003).
9. Shigihara, T. *et al.* CXCL10 DNA vaccination prevents spontaneous diabetes through enhanced b cell proliferation in NOD mice. *J Immunol* 175, 8401–8 (2005).
10. Peng, D. *et al.* Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature* 527: 249-53 (2015).
11. Vojta, A. *et al.* Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 44: 5615-28 (2016).

12. Lasch, S. *et al.* Anti-CD3/Anti-CXCL10 Antibody Combination Therapy Induces a Persistent Remission of Type 1 Diabetes in Two Mouse Models. *Diabetes* 64: 4198-211 (2015).
13. Shigihara, T. *et al.* CXCL10 DNA vaccination prevents spontaneous diabetes through enhanced  $\beta$  cell proliferation in NOD mice. *J. Immunol.* 175, 8401–8 (2005).