

Estudio Computacional de la Dinámica Funcional en la Expresión Omica para la Enfermedad de Krabbe

Andres Reinaldo Chacon Prada

Estudiante - EBI TOOLS - MBC - Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia.

Resumen

La enfermedad de Krabbe, es una leucodistrofia autosómica recesiva. En su etio - fisio - patología, se menciona, que es resultante de una deficiencia de galactocerebrosido Beta - galactosidasa. Está encima es requerida en la ruta catabólica de la formación de ceramida y galactosa. Se conoce que el compuesto citotóxico resultante de más de 200 mutaciones

en este gen, ubicado en el cromosoma 14q31, es la galactosilesfingosina, la cual causa daño en los oligodendrositos. Se observa su aparición y rápida evolución, entre los 3 y 6 meses de edad, y es de carácter mortal. La supervivencia, por encima de los 2 años de edad, es muy poco frecuente. En este trabajo se usaron herramientas del Ebi Instituto de Bioinformática Europeo para la búsqueda y análisis de datos biológicos, esto con miras a generar una mejor comprensión de la enfermedad de Krabbe. Esta búsqueda

y el uso de herramientas, están planteadas en tres escalas, la primera es genómica, la segunda es proteomica y la tercera es metabolica, por lo cual se usarán varias de las herramientas EBI propuestas en este curso, y algunas otras más que se irán anexando en el camino.

Palabras Clave

Leukodystrophy, Globoid Cell, Krabbe Disease, Atypical, due to Saposin [A] Deficiency, Galactocerebrosidase Deficiencies.

Introduccion

La connotación de enfermedad desatendida o huérfana varía de país a país, en Colombia, es aquella enfermedad crónica, debilitante, grave, que amenaza la vida y con una prevalencia (la medida de todos los individuos afectados por una enfermedad dentro de un periodo particular de tiempo) menor de 1 por cada 5.000 personas, comprenden, las enfermedades

raras, las ultras huérfanas y olvidadas, esto según la (Ley 1392 de 2010/Ley 1438 de 2011)".(MINSALUD 2011) La evolución clínica de los pacientes cursa con, signos motores, entre ellos rigidez y debilidad muscular, esto es muy grave, ya que las dificultades para la alimentación y respiración incrementan

gradualmente. También se observa pérdida de la capa mielínica en el encéfalo, oligodendrocitos en el sistema nervioso central, se conoce como característica única en su diagnóstico, la agregación de macrófagos ingurgitados, que se conocen como células globoides, en el parénquima y alrededor de los vasos sanguíneos. (Robbins y Cortan 2010) Por razones académicas y para este ejercicio, se subraya la pregunta problema. Para la siguiente entrega será incorporada al documento. ¿Cuáles son las dinámicas moleculares entre la expresión genética, Proteomica y Metabolomica de los genes mutados en la Enfermedad de Krabbe? Esta pregunta es importante en el desarrollo de nuevas terapias que involucren áreas como la biología molecular, biología computacional, biología sintética y de sistemas, pues sabemos que esta leucodistrofia es un trastorno grave, que genera destrucción de la materia blanca, lo cual desencadena en la pérdida progresiva de capacidades mentales y físicas. No existen tratamientos al día de hoy, se han propuesto tratamientos experimentales tales como el trasplante de sangre de cordón umbilical en estado presintomático. (Khanal et all 2024).

A continuación, se muestra la ruta metabólica de degradación de esfingolípidos, aca podemos observar dónde ocurre la enfermedad de Krabbe. Se puede observar, como el paso de galactosilceramida a ceramida, es mediado por la enzima Beta - galactosilceramidasa, la cual falla en su función, es importante recalcar que esta enzima participa en dos pasos metabólicos uno es entre esfingosina a psicossina y la segunda, que es en donde se ubica la patología.

Según la investigadora Lina García, investigadora del centro de bioquímica de la Universidad de los Andes, CIBI, La epidemiología de la enfermedad, no tiene referentes en Colombia y si Latinoamérica es pobre, el sub diagnóstico también es una característica presente en Latinoamérica, para Europa, se encuentra que es de 1:100.000 recién nacidos. (García y Uribe) 2017) La falta de tratamientos de calidad y de fácil acceso, para la La enfermedad de Krabbe en Colombia, Latinoamérica y el mundo.

La hace un blanco perfecto de investigación, la comprensión de las dinámicas moleculares entre la expresión genómica, proteómica y metabolómica de algunos genes mutados en esta enfermedad, permitirá desarrollar nuevas vías de abordar el tratamiento de la enfermedad. La disfunción en el almacenamiento lisosomal, se caracteriza por la acumulación de intermediarios metabólicos en este organelo. En este caso, la leucodistrofia de células globoides conduce a la pérdida progresiva de la mielina y otros esfingolípidos terminales. En la fisiopatología se propone que su surgimiento se da por la acumulación del metabolito psicósina, que es neurotóxico.

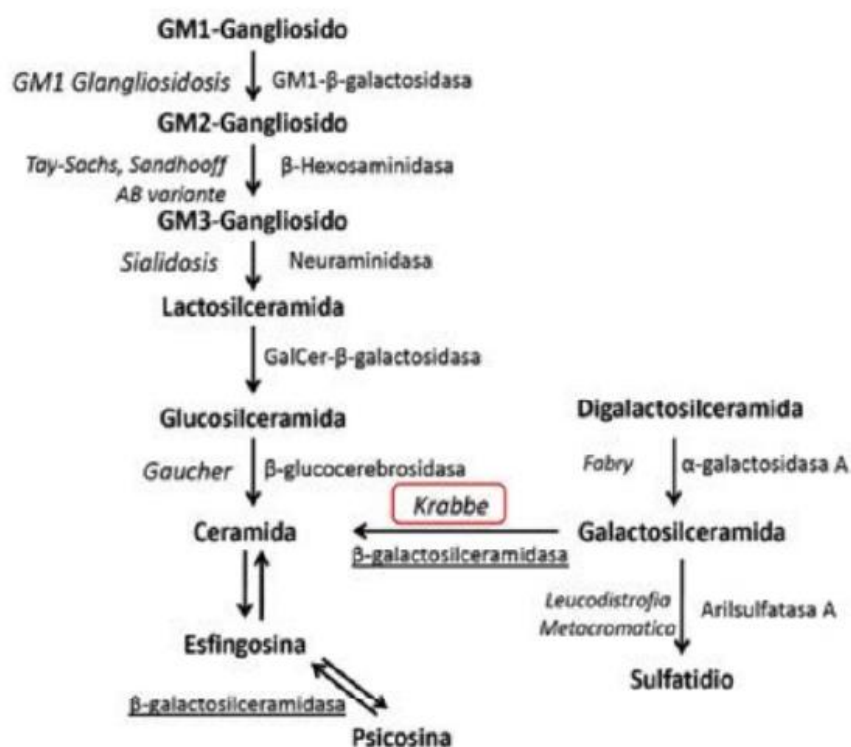


Figure 1. Ruta metabólica de Degradación de Esfingolípidos. Tomado de Garcia y Uribe 2017[1].

Metodología

Para llevar a cabo el estudio computacional de la dinámica funcional en la expresión omica para la enfermedad de Krabbe, se propone la integración de las herramientas utilizadas en la clase de EBI TOOLS, para estudiar la genómica funcional, la proteómica y la metabolómica, **de la dinámica de 1 gene principal, con más de 200**

mutaciones relacionadas, estos genes serán escogidos por ser aquellos que presentan más sobre expresión, mayor mutación, o mayor interconexión.

Las herramientas serán integradas en cada entrega, esto según lo estudiado en clase. Para la segunda entrega, las herramientas a integrar son las requeridas en el documento, Lineamientos de Entregas de Proyectos. EBI Bioinformatics Tools 2024-2. Entrega 2 (30 de Agosto) ENSEMBL, Ontologies, ENA, FAIR Principles

Ensembl

El genoma humano utilizado fue Human (GRCh38.p14), la búsqueda se dio sobre el Loci asociado con la actividad enzimática de Galactosylceramidase. A continuación, se muestran las actividades a realizar con Ensembl.

- Ubicación cromosómica y ubicación en hebra del gen
- Identificar los transcritos alternativos
- Identificar las variantes SNV
- Explorar la filogenética y la homología

Ontologías [GO]

- Ontología Genética [GO]
- Ontología Fenotípica de Mamíferos [MPO]

European Nucleotide Archive ENA

- Encontrar todas las secuencias y anotaciones disponibles para un gen de interés.
- Utilizar la similitud de la secuencia, para buscar datos (incluidos datos sin procesar sin ensamblar) y descubrir lo que se sabe, sobre su nueva secuencia.

La metodología FAIR, fue seleccionada, para garantizar el buen manejo de datos públicos, La metodología escogida para el manejo de datos públicos en esta investigación, es la recomendada por EBI y el Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC).

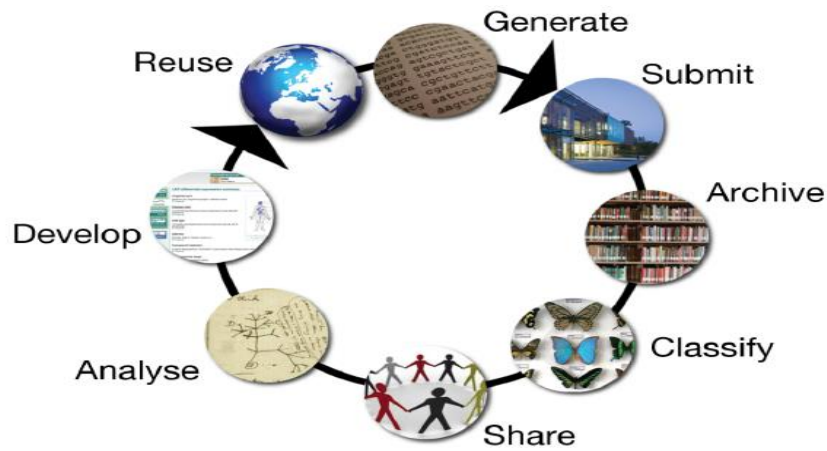


Figure 2. Metodología para manejo de datos publicos. Tomado de EBI - Using publicly available data. 2024[1].

Análisis de Resultados

Ensembl

Al explorar la variante en esta herramienta, fue buscada por el código rs979812, esta variante fue genotipada por illumina_immunoChip, Affy GeneChip 500K. esta variante reporta 3009 muestras genotípicas, que se encuentran asociadas con dos fenotipos.

La ubicación Cromosómica se da en la hebra forward, en la dirección Chromosome 14: 87,997,870-87,997,970.

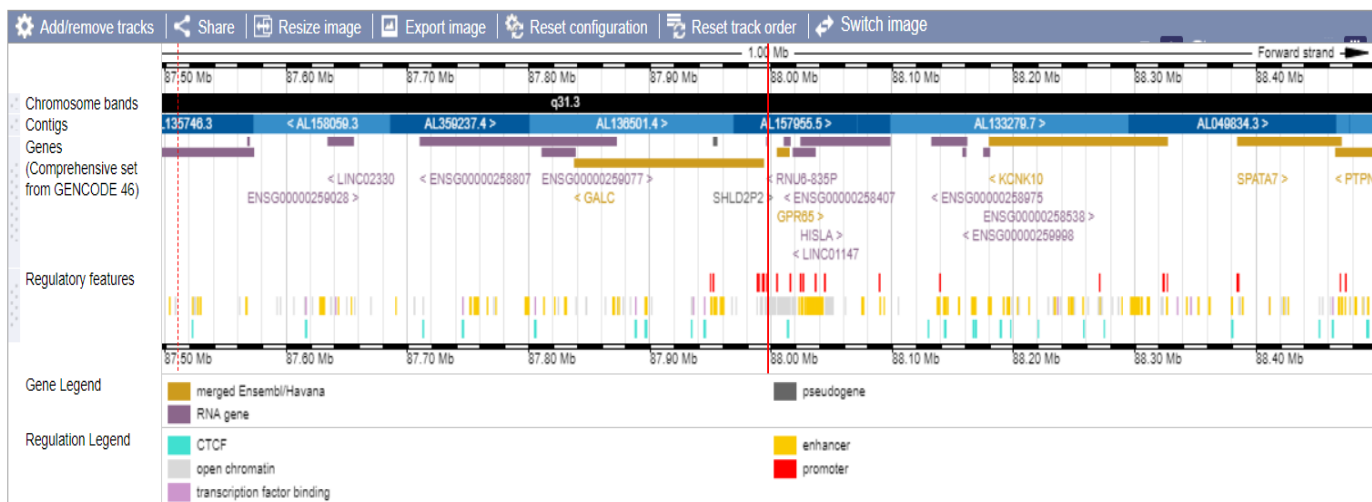


Figura 3. Ubicación cromosómica gen relacionado con la enfermedad de Krabbe

Podemos observar el locus en el cromosoma 14, y es importante resaltar lo siguiente, su ubicación se da en una región rica en cromatina abierta, es la zona con más promotores, con características regulatorias, en el loci, lo cual nos muestra que su fisiopatología se relaciona específicamente con el control regulatorio transcriptómico, que, con la propia expresión proteica, como podría esperarse.

A continuación, se realiza un análisis mas detallado de algunas estadísticas cromosómicas relevantes.

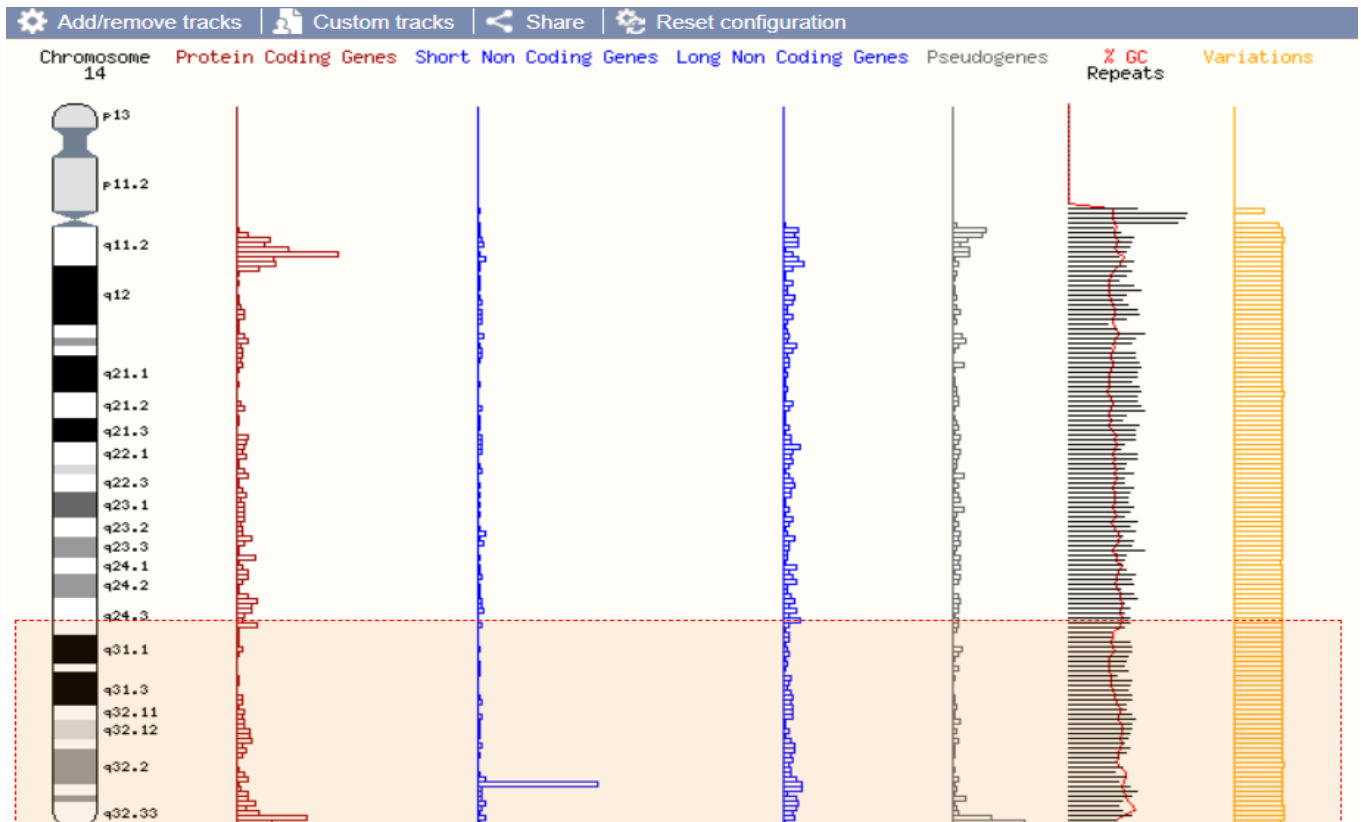


Figura 4. Representación grafica de algunas características de codificación y variabilidad del gen asociado con la enfermedad de Krabbe.

En la figura numero 4 podemos observar lo siguiente, la zona en donde se ubica el gen, q31.1 es una zona con poca codificación de proteínas, con poca o nula presencia de genes cortos de codificación, con presencia de genes largos no codificantes, con poca presencia de seudogenes, altas repeticiones CG y variaciones en una alta proporción.

El cromosoma tiene 107.043.718 bps, 822 genes codificantes, 982 genes no codificantes, entre los cuales se tiene, 237 genes pequeños no codificantes, 666 genes largos no codificantes, 79 Misc genes, 530 seudogenes y 34.079.352 variantes pequeñas.



Figura 5. Información detallada de la ubicación cromosómica asociada con la enfermedad de Krabbe.

En la figura numero 5 podemos observar la ubicación precisa de los SNPs e indels presentes en la región. Los factores de transcripción se ubican en la zona 87.10 – 87.12, también es muy importante resaltar que en las direcciones cromosómicas que se encuentran antes de la zona de anclaje del transcriptor, se pueden observar varias zonas de amplificación con SNPs.

Los polimorfismos sencillos de un nucleótido aparecen a lo largo de zonas de cromatina abierta específicas para humanos, el numero de GERPs es de 91, estos son importantes para estudios de evolución.

A continuación, en la figura numero 5, se observa la genómica comparativa entre el cromosoma 14 de humanos y el cromosoma 12 y 14 de ratones, se puede analizar que, dos pequeñas zonas de cromosoma humano 20M y 50M – 60 M, se encuentran representadas en 4 zonas del cromosoma 14 de ratones, la gran mayoría del cromosoma 14 de humanos, está ubicada analógicamente en el cromosoma 12 de ratones, entre 40 M y 11.50 M.

Synteny between Human chromosome 14 and Mouse

Figura 6. Comparación del Cromosoma 14, con el cromosoma 12 y 14 de *Mus Musculus*.

Lo anterior cobra vital importancia, cuando se requiere desarrollar un tratamiento para la enfermedad de Krabbe, pues la fisiopatología, no solo puede responder a una mutación en los genes que codifican proteínas, también puede responder a mutaciones en zonas no codificadoras de proteínas, como lo son las zonas codificadoras de genes de RNA. Es por esto que las enfermedades con mutaciones multialelicas y multigenicas, no solo responden a mutaciones en su estructura, también son altamente dependientes en mutaciones en los factores de transcripción y RNAs relacionados.

En la multirregión específica para el cromosoma 14 de humanos, podemos identificar la región de variante de expresión fenotípica alélica, lo importante es que abajo podemos observar las regiones que estas relacionadas con la expresión patológica, cada región alélica tiene relacionada una región patológica.

También podemos observar la expresión de esta zona cromosómica en 54 tejidos por GTEx y RNASeq, los elementos reguladores cis, combinados en todos los tipos celulares.

GWAS Catalog - Gene Ontology

Información de la variante

- Locación 14:87997920
- Región citogenética 14q31.3
- Genes mapeados relacionados GPR65, RNU6-835P

Presenta dos asociaciones patológicas una con la enfermedad de Parkinson y la otra con la actividad enzimática de la galactosylceramidasa, que es la que nos importa para efectos de esta investigación.

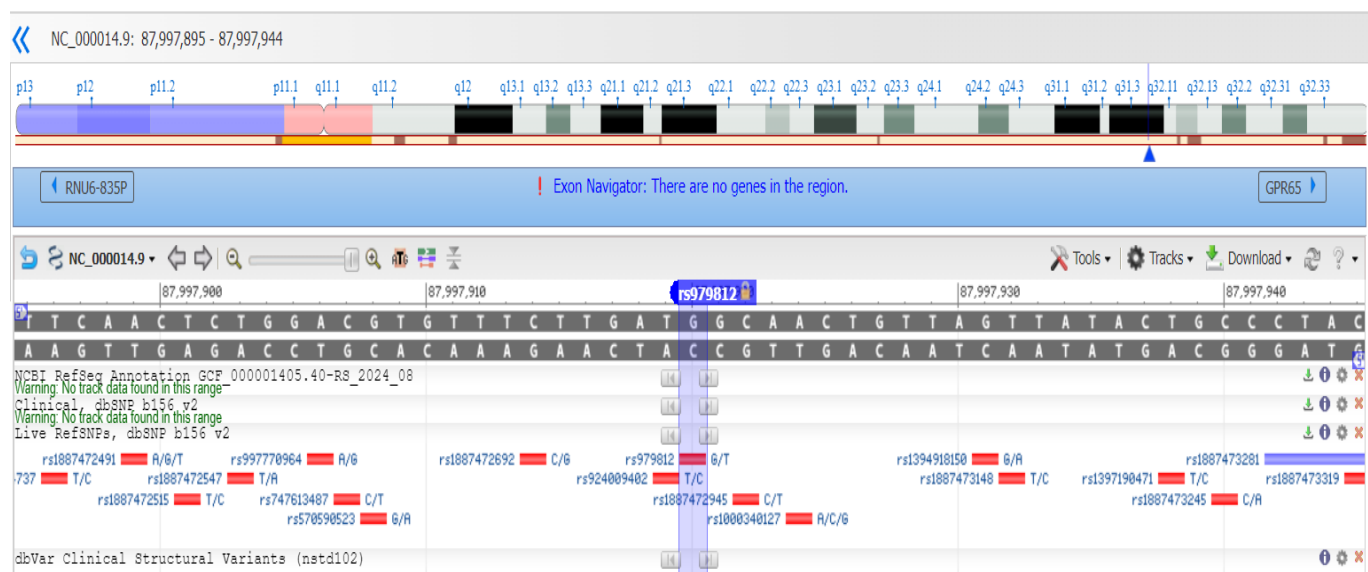


Figura 9. Ubicación específica de la variante clínico patológica para en gen RNU-835P en el cromosoma 14.

El SNP encargado de generar la variante patológica se ubica en la región cromosómica 87 99 79 20 y se encuentra registrada bajo en ID, rs979812. El cambio se da de G a T.



Open Targets

En open targets se reportan 162 enfermedades relacionadas con asociaciones genéticas 26, rutas y sistemas 2, expresión de RNA 28.

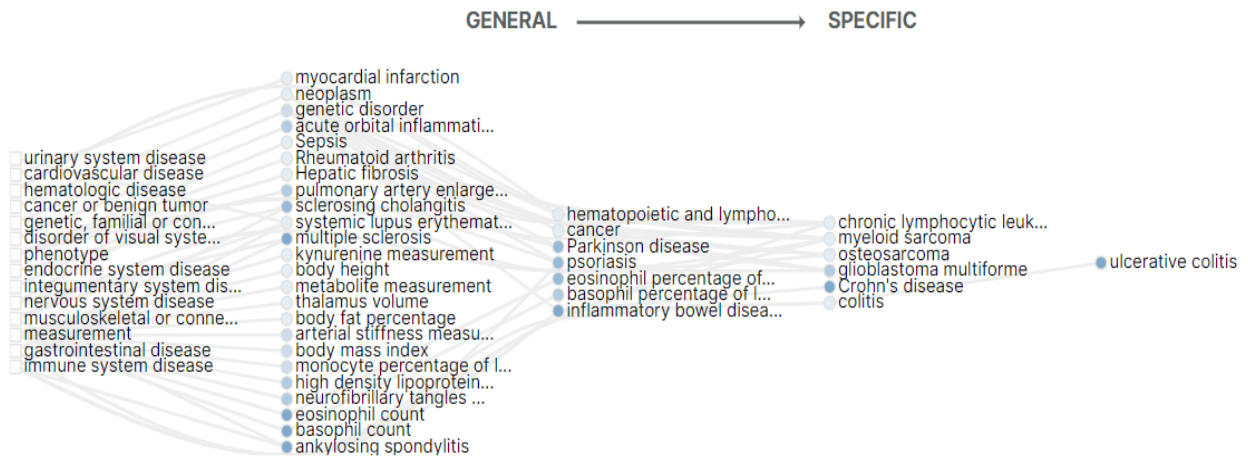


Figura 11. Expresión patológica de GPR65

Europe PMC



Search life-sciences literature (44.777.754 articles, preprints and more)

Krabbe Disease AND (FIRST_PDATE:[1960 TO 2024])

Se encontraron 3491 resultados entre 1960 y 2024, ordenados por su relevancia científica, para la enfermedad de KRABBE, los primeros puestos no presentan citaciones, ordenados por su número de citaciones, el artículo más citado es del 2016, y a sido citado 1231 veces.

- 2523 artículos de investigación.
- 930 artículos de revisión
- 29 preprints
- 3 libros y documentos

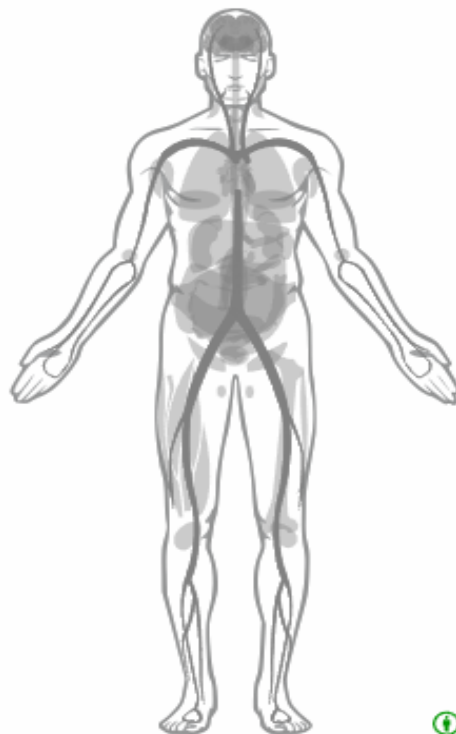
Expression Atlas

ensg00000140030 (GPR65) *Homo sapiens* G protein-coupled receptor 65

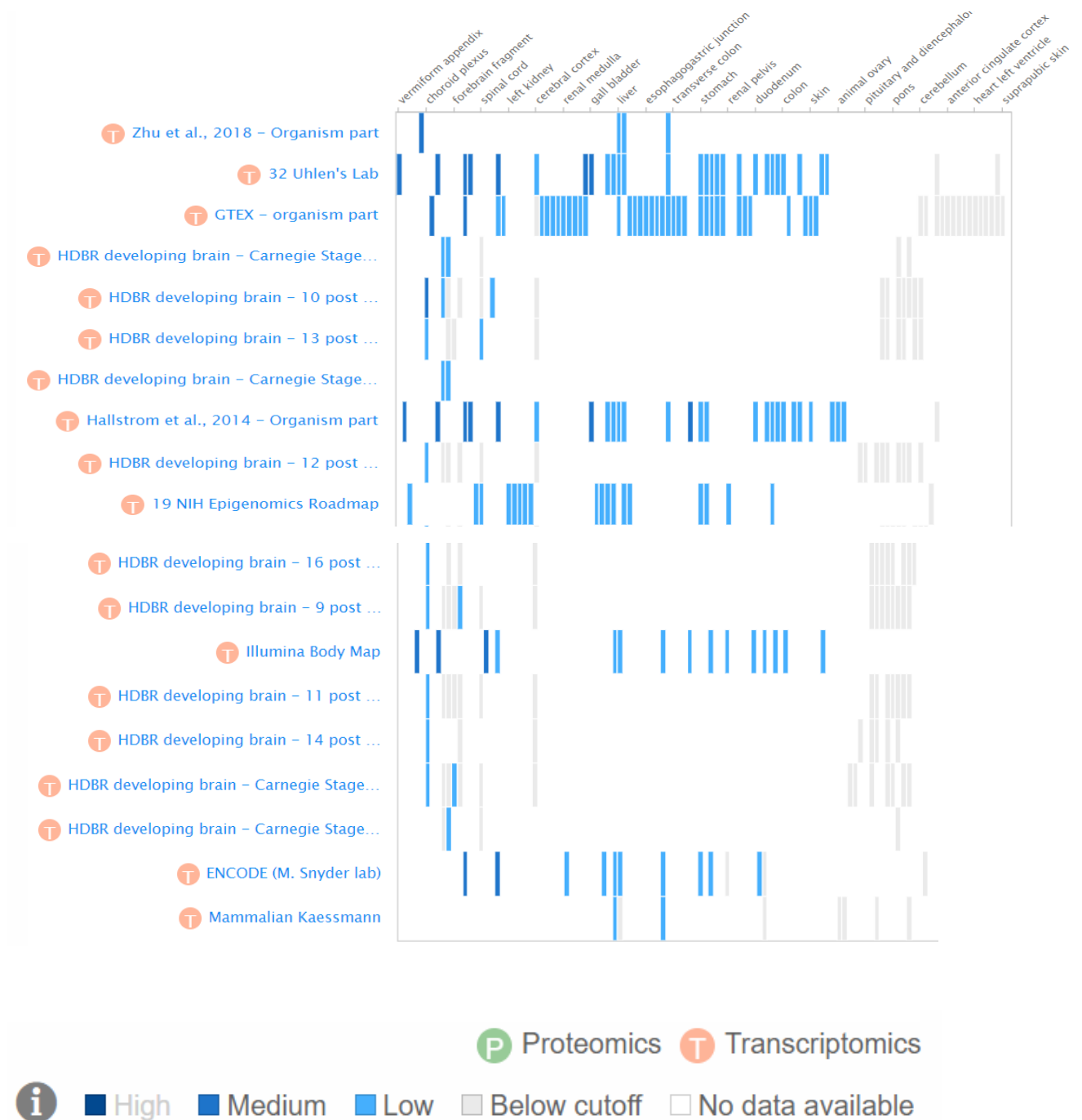
Showing 19 experiments:

Homo sapiens

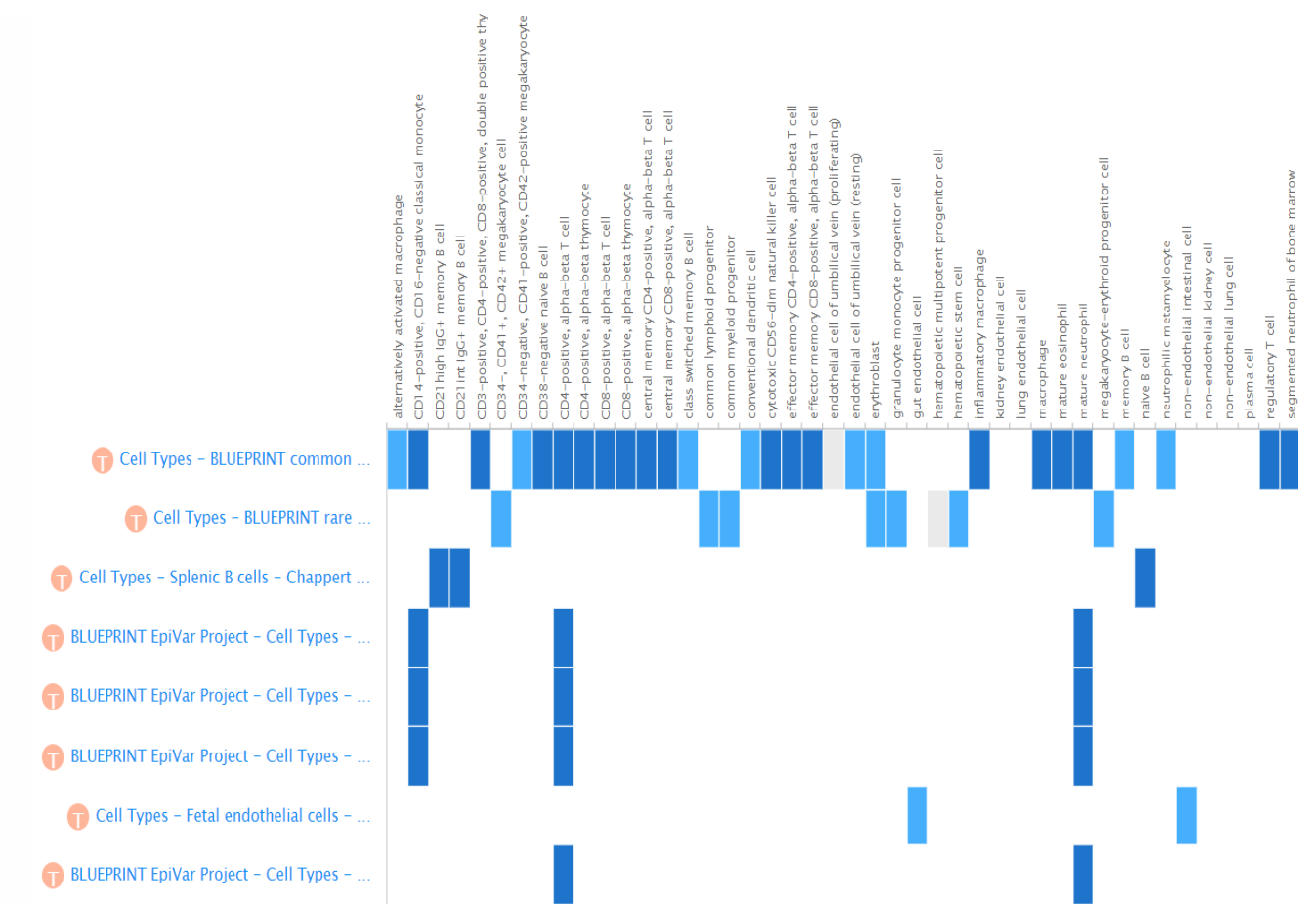
- ☒ Organism part
- ☐ Age
- ☐ Cell line
- ☐ Cell type
- ☐ Developmental stage
- ☐ Disease
- ☐ Individual



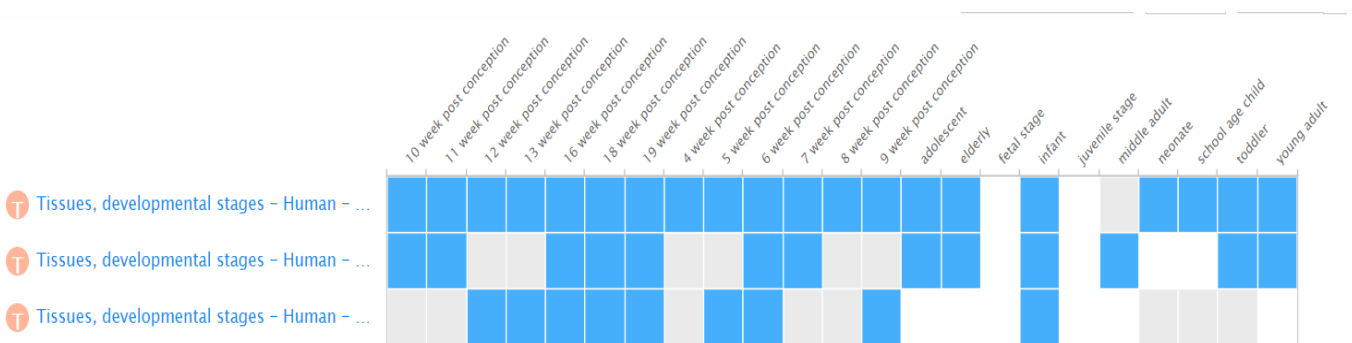
Podemos analizar lo siguiente, el gen GPR65, se muestra en 19 experimentos en partes de un organismo humano, masculino, realizados por transcriptómica en su totalidad, nos muestra en el eje X la expresión diferencial de gen, alto, medio, bajo, en los diferentes órganos y tejidos, en el eje Y, encontramos, los laboratorios o grupos de investigación que realizaron el aporte.



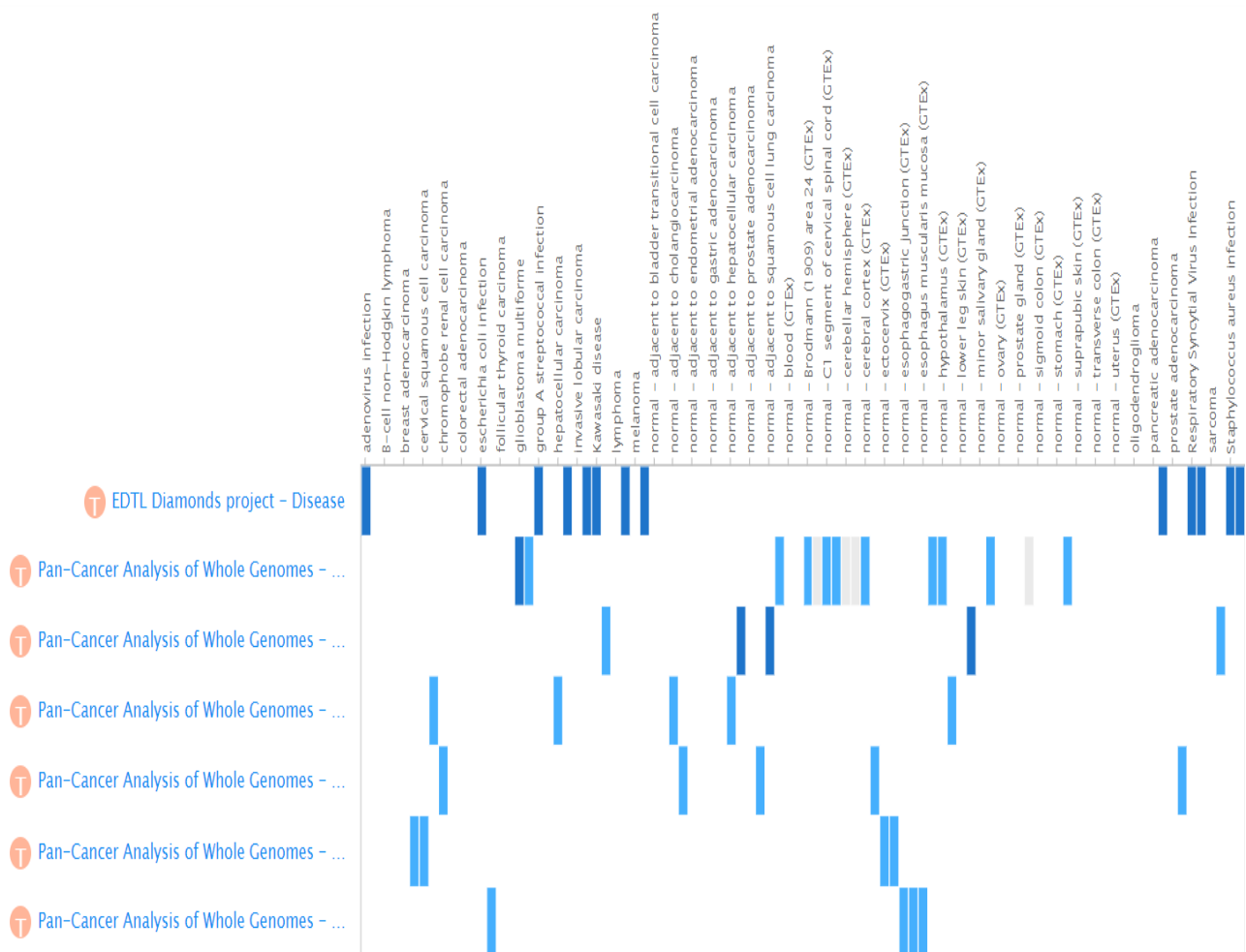
En la expresión diferencial por tejidos podemos observar, el estudio que más reporta expresión de este gen en diferentes tejidos, es Hallstrom et al 2014. La sobre expresión del gen la podemos ubicar en su mayoría en los siguientes sistemas u órganos, riñones, medula, en los plexos coroides, que son estructuras vasculares del encéfalo. La expresión normal la podemos observar en tracto digestivo bajo y piel, entre otras. La expresión nula se observa en sistema cardiovascular, entre otros.



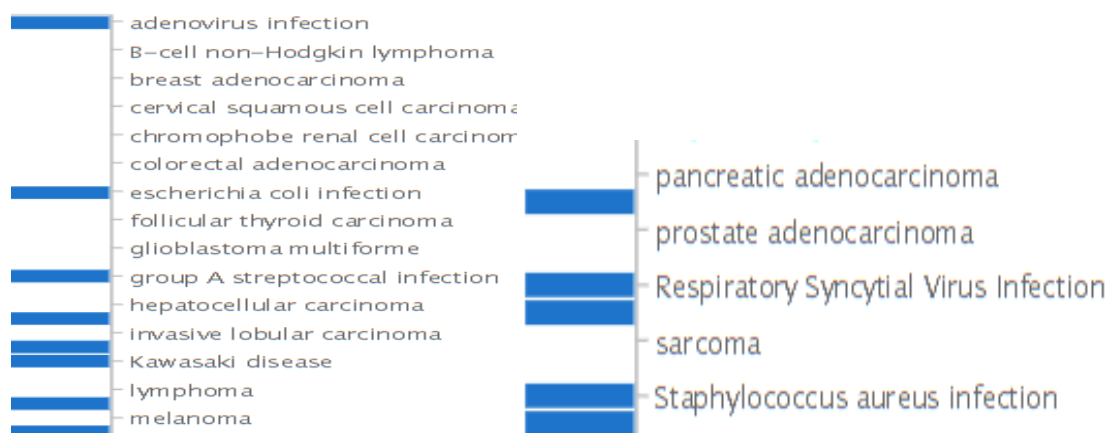
En los tipos celulares que expresan el gen asociado a la enfermedad de KRABBE, tenemos que, las células CD4 y CD8, CD56, son las que lo expresan con un nivel alto, se encuentra expresado con normalidad en células sanguíneas como los eritrocitos, y su expresión es nula, en células del tracto gastrointestinal y otras más.



Podemos apreciar los estados de desarrollo en donde se a encontrado su expresión, y son todos los estados, menos estado fetal y juvenil, esto por falta de datos e investigaciones.



En 21 experimentos se ha reportado lo siguiente, para la expresión patológica del gen GPR65, se han identificado.



Se expresa patológicamente en infecciones, carcinomas, linfomas, melanomas, enfermedad de Kawasaki, adenocarcinomas pancreáticos, infecciones por virus sincital respiratorio.

Conclusiones

Discusión

Bibliografía

[1] Terminos MeSH. 2024. Consultado en: 129 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>.

[2] Garcia, L. Uribe, A. Analisis de la beta-Galactoserincelimidasa Leucocitaria en Pacientes Colombianos con Sospecha Clínica de Enfermedad de KRABBE, un Tamizaje de Alto Riesgo. 2017. Universidad de Los Andes.

[3] MINSALUD Colombia. Enfermedades Huerfanas. 2011. Consultado en: <https://minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/enfermedades>

[4] P, Khanal. S, Patil. K, Bhattacharya.A,Shrivastava. V. Bhandare. Exploring the globoid cell leukodystrophy protein network an therapeutic interventions. Nature portafolio. 2024. Consultado en:— <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66437-8>

[5]

[6]

