



Avances en Diabetología



P-081. - USO DE INHIBIDORES EPIGENÉTICOS PARA LA MEJORA DE LA DIFERENCIACIÓN ENDOCRINA IN VITRO

M. Fontcuberta Pi-Sunyer, S. Cervantes, A. García, L. Sánchez, R. Gomis y R. Gasa

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. Barcelona.

Resumen

Introducción y objetivos: Durante el desarrollo embrionario, el programa de diferenciación celular está controlado por factores de transcripción específicos de linaje y por mecanismos epigenéticos. El factor de transcripción bHLH Neurogenina3 (Neurog3) es esencial para la iniciación del programa de diferenciación endocrina en el páncreas. A nivel epigenético, la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) es una de las marcas de cromatina que participan en la regulación génica durante el desarrollo endocrino-pancreático. En un estudio previo mostramos que la activación transcripcional en respuesta a Neurog3 se correlacionaba con pérdida de la marca H3K27me3 en las regiones promotoras de sus genes diana, lo que sugería una estrecha relación entre Neurog3 y los reguladores epigenéticos de esta marca. En este estudio hemos utilizado inhibidores químicos de estos reguladores (de la metiltransferasa EZH2 y de las demetilinas UTX/JMJD3) para determinar su papel en la actividad transcripcional de Neurog3. Adicionalmente, hemos investigado si la manipulación combinada de la actividad de EZH2 y de la expresión de factores de transcripción de diferenciación puede promover la diferenciación de fibroblastos hacia células insulino-positivas.

Material y métodos: Hemos usado la línea ductal mPAC como modelo de diferenciación endocrina dependiente de Neurog3. Hemos utilizado los inhibidores químicos GSK-126 y EI-1 (inhibidores de EZH2) y GSK-J4 (inhibidor de UTX/JMJD3). Hemos obtenido fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de e12.5-e14.5 para la diferenciación. Hemos utilizado un adenovirus recombinante que expresa los factores Pdx1, Neurog3 y MafA. Los niveles totales de H3K27me3 se han analizado por Western Blot, la expresión de genes mediante Real Time PCR y el enriquecimiento de marcas epigenéticas de interés mediante ChIP.

Resultados: Nuestros experimentos muestran que los inhibidores de las desmetilasas JMJD3/UTX y de la metilasa EZH2 provocan un incremento y una disminución significativa de los niveles totales de la marca H3K27me3 en las células mPAC respectivamente. El inhibidor GSK-J4 bloquea significativamente la inducción de genes endocrinos promovida por Neurog3 en estas células. Contrariamente, los inhibidores EI-1 y GSK-126 potencian la acción de Neurog3 sobre estos mismos genes. En cualquier caso, la pérdida de la marca H3K27me3 sin la presencia del gen inductor Neurog3 no es suficiente para activar transcripcionalmente los genes silenciados, a excepción de genes bivalentes que muestran expresión a nivel basal (por ejemplo Atoh8). En los ensayos de transdiferenciación, la expresión ectópica de Pdx1+Neurog3+MafA en los MEF activa moderadamente la expresión de genes endocrinos como *NKX2.2*, *NeuroD1* y *Insulina*. Esta

activación se ve potenciada con la adición de los inhibidores de EZH2.

Conclusiones: La manipulación de la actividad de reguladores epigenéticos de la marca H3K27 puede ser una estrategia útil para mejorar la eficiencia de protocolos de diferenciación endocrina y transdiferenciación in vitro hacia célula beta.