

EDICIÓN DEL GENOMA PARA TRATAR ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Introducción

Las mitocondrias son organelas fundamentales de la célula encargadas de la producción de energía, entre otras funciones. Ellas son las responsables de producir la mayoría de la energía necesaria para garantizar el funcionamiento del organismo. Por lo tanto, cuando las mitocondrias fallan, como es el caso de las enfermedades mitocondriales, las células no son capaces de generar energía suficiente y mueren. Esto conduce al mal funcionamiento de los órganos que tienen mayores requerimientos energéticos como el corazón, el cerebro y los músculos.



A pesar de décadas investigando este tipo de enfermedades, todavía no se han establecido tratamientos apropiados para tratarlas.

Las proteínas mitocondriales están codificadas tanto por el ADN nuclear (nDNA) como por ADN mitocondrial (mtDNA). Las mitocondrias tienen su propio sistema de traducción para sintetizar proteínas codificadas en mtDNA, las cuales son esenciales para la replicación, transcripción y traducción del mtDNA y el ensamblaje de complejos del sistema de fosforilación oxidativa. Mutaciones en el nDNA o en el mtDNA, o defectos en la maquinaria de traducción, causan anomalías en las proteínas que resultan en enfermedades mitocondriales. Estudios recientes han identificado mutaciones homocigóticas en el gen *gfm1*, que codifica el factor

de traducción mitocondrial EFG1, en pacientes con enfermedad mitocondrial. EFG1 cataliza la translocación del peptidil tRNA desde el ribosomal acceptor aminoacyl site hacia el peptidyl site, después de la formación del enlace peptídico, con la consiguiente remoción del tRNA deacilado. Por lo tanto, mutaciones en EFG1 pueden causar deficiencias en los mecanismos de traducción y funcionamiento de la mitocondria generando así, la enfermedad mitocondrial. Avances recientes en tecnologías de edición genómica, proporcionan la posibilidad de realizar correcciones dirigidas a mutaciones en genes específicos, como las que causan este tipo de enfermedad. Estas tecnologías tienen algunas limitaciones como por ejemplo integración aleatoria de vectores, control incompleto sobre el número de copias del transgen y su nivel de expresión, riesgo de generación de mutagénesis y baja eficiencia. Recientemente, nuestro laboratorio ha desarrollado una nueva estrategia de edición del genoma denominada Homology-Independent Targeted Insertion (HITI) la cual está basada en el sistema de CRISPR/Cas9, que utiliza elementos de la vía NHEJ para lograr un eficiente knock-in tanto en células que proliferan como en las que no. Nuestro método HITI puede corregir mutaciones en genes con una frecuencia mínima de inserción/delección y además puede ser aplicado a células postmitóticas en modelos *in vivo*.

Objetivo específico

Desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades mitocondriales utilizando la tecnología HITI para una eficiente corrección de la mutación del gen *gfm1*.

Diseño experimental

1. Establecimiento del sistema HITI para corregir la mutación en el gen *gfm1*.

1-a. Construcción de vectores basados en HITI: el método HITI permite una alta eficiencia de knock-in de un locus específico tanto en células que se dividen como en células que no se dividen *in vivo*. En este sistema, el plásmido donante (secuencia con la mutación corregida que se quiere insertar en el genoma) no posee brazos con homología. Por lo tanto el daño en la doble hebra de DNA causado por el Cas9 no se puede reparar por la vía de recombinación homóloga (HDR). Por lo tanto, el ADN donante es asociado con el sitio de corte del Cas9, el cual corresponde con la secuencia objetivo del genoma (la que tiene la mutación). El daño generado en la doble hebra del ADN es reparado por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ del inglés Non-homologous DNA End Joining).

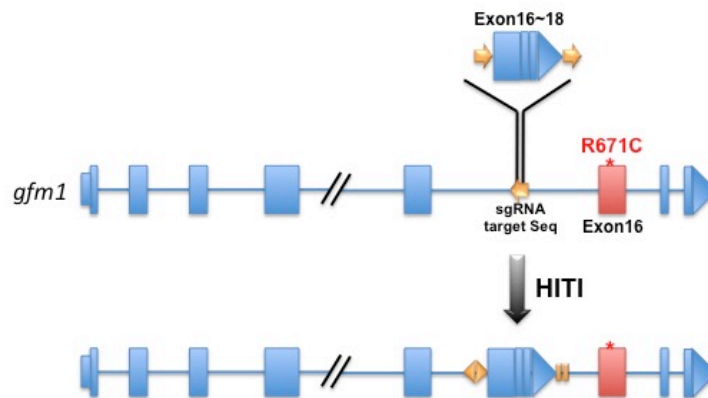


FIGURE 1. Schematic representation of *gfm1* correction through HITI
Yellow arrows represent sgRNA target sequence. Blue boxes, exons of *gfm1*.
Red box, exon 16 including mutation.

Si la reparación del corte se da sin errores, el sitio será reconocido nuevamente por el Cas9, y el ciclo de corte y reparación se seguirá repitiendo hasta que se inserte el ADN donante, destruyendo así la secuencia objetivo del Cas9. Para restaurar la expresión de EGF1, diseñaremos un vector que contenga el ADN donante con la secuencia correcta del *gfm1* cDNA, desde le exon 16 al 18, y después induciremos la expresión del ADN donante en el intron 15 del sitio con la mutación (fig 1)

1-b. Evaluación de la eficiencia en células primarias: Para evaluar la eficiencia y especificidad del sistema, introduciremos el vector con el ADN donante, el vector de expresión de Cas9 y el sgRNA en neuronas o hepatocitos de ratón. Seguidamente evaluaremos la eficiencia del sistema y si la corrección generada restablece la expresión del EFG1, la traducción mitocondrial y su función *in vitro*.

2. Corrección genómica en iPSCs humanas derivadas de pacientes con enfermedad mitocondrial.

2-a. Corrección genómica en iPSCs humanas: Introduciremos los vectores del paso 1-b en las iPSCs derivadas de los pacientes y evaluaremos si se re-establece la expresión de EFG1.

2-b. Evaluar si la corrección realizada restaura la función de células diferenciadas: Primero induciremos la diferenciación de las iPSCs derivadas de los pacientes con y sin la corrección a

neuronas o hepatocitos-like cells. Después evaluaremos si la corrección re-establece la expresión de EFG1 y la función y traducción mitocondrial.

Adicionalmente evaluaremos si la función de células diferenciadas puede ser rescatada. Para las neuronas analizaremos estabilidad celular, tasa de diferenciación y niveles de actividad. Para los hepatocitos like cells analizaremos los niveles de lactato, y la actividad de la creatinina quinasa y de la alanine aminotransferase en las células o en el medio de cultivo.

3. Corrección genómica en organoides derivados de células de pacientes con enfermedad mitocondrial.

Para desarrollar estrategias de corrección genómica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la mitocondria, investigaremos si la tecnología HITI permite una eficiente corrección de mutaciones en organoides humanos.

3-a. Modelar la enfermedad mitocondrial utilizando organoides: producirémos organoides de cerebro e hígado utilizando iPSCs derivadas de los pacientes. Un organoide es una representación simplificada de un órgano producida en el laboratorio en un cultivo 3D. Una vez establezcamos los organoides los analizaremos histológicamente, analizaremos la estabilidad celular, la tasa de diferenciación y la actividad mitocondrial.

3-b. Corrección de la mutación en *gfm1* en los organoides humanos: Para la corrección de la mutación en los organoides haremos sub-clones de los vectores de HITI (Cas9 y sgRNA y el ADN donante) en vectores virales adenoasociados (AAV adeno-associated virus) y luego los empacaremos en los AAV. Para generar la expresión el ADN donante inyectaremos los AAV directamente en los organoides. Para evaluar la eficiencia de la corrección, haremos secuenciación, evaluaremos la expresión de EFG1, y la función y traducción mitocondrial en los organoides.

3-c Investigar si la corrección de la mutación revierte el fenotipo de los organoides: Se ha reportado que algunos pacientes con mutaciones en *gfm1* hipoplasia en el vermis cerebelar y atrofia pontina severa del tallo cerebral. Para investigar si la corrección realizada restaura el desarrollo y función de los organoides de cerebro haremos análisis histológico y electrofisiológico de los organoides después de la inyección de los AAV con los vectores de HITI. Para evaluar la función hepática monitorizaremos diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos.

-Significancia e impacto-

Nuestros datos preliminares han demostrado que la tecnología HITI es efectiva para corregir mutaciones in vivo tanto en el hígado como en las células del cerebro (las cuales no se dividen). ***Estos hallazgos nos permiten creer que HITI puede ser utilizado para corregir enfermedades mitocondriales.***

Esta tecnología podría ser eficiente para tratar diferentes tipos celulares como las células madre, específicamente células progenitoras del sistema nervioso. Las cuales dependen de su nicho para la autorenovación.

Este estudio sería la primera prueba de concepto hacia el tratamiento de enfermedades asociadas a la mitocondria en general, y en particular a enfermedades asociadas a mutaciones en *Gfm1*.

Cronograma

	Año 1	Año 2
1-a Construcción de los vectores HITI	→	
1-b Evaluación de la eficiencia en células primarias	→	
2-a <u>Corrección de la mutación en iPSCs humanas</u>	→	
2-b Evaluar si la corrección restaura la función de células diferenciadas.	→	
3-a Modelación de la enfermedad en <u>organoides</u> .		→
3-b Corrección de la enfermedad en <u>organoides</u> .		→
3-c Evaluar si la Corrección de la enfermedad en <u>organoides restaura en el fenotipo.</u>		→

Presupuesto

- Se necesita apoyo económico para pagar el salario de un postdoc y materiales. (**\$100,000 por año**).
- Se calcula un periodo tiempo de dos años.

EQUIPO de INVESTIGACIÓN LIDERADO POR EL INVESTIGADOR

Profesor Juan Carlos IZPISUA BELMONTE

Professor Gene Expression Laboratory
Roger Guillemin Chair

» Institución
Salk Institute for Biological Studies
La Jolla (San Diego - California) USA