

## **CORRECCIÓN DEL GEN IN VIVO PARA TRATAR LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS**

### **ANTECEDENTES**

Las mitocondrias son orgánulos únicos que juegan un papel crítico en la creación de energía dentro de las células. Por lo tanto, cuando fallan, la cantidad de energía disminuye severamente dentro de las células. La enfermedad mitocondrial es un trastorno crónico o genético que se debe a la disfunción de células y órganos causada por deficiencias en la producción de energía mitocondrial. Se observa una variedad de síntomas, p. Ej. debilidad muscular, crecimiento deficiente, problemas de aprendizaje, problemas neuronales, enfermedades hepáticas y cardíacas, entre otros. A pesar de décadas de esfuerzos, el tratamiento óptimo aún no se ha establecido. Los genes asociados a las mitocondrias codificados en el propio genoma mitocondrial (ADNmt) o genoma nuclear son esenciales para el mantenimiento de las mitocondrias funcionales. Los genes de las mitocondrias codifican factores esenciales para la replicación, transcripción, traducción y ensamblaje de ADNmt de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa. Las mitocondrias tienen su propio sistema de traducción para sintetizar proteínas codificadas por ADNmt. Por lo tanto, los defectos de la maquinaria de traducción pueden causar anomalías mitocondriales, resultando en enfermedades mitocondriales. Estudios recientes han identificado las mutaciones homocigotas en el gen GFM1, que codifica el factor de traducción mitocondrial EFG1, en pacientes con enfermedad mitocondrial. EFG1 cataliza la translocación de peptidil tRNA desde el sitio aminoacilo aceptor ribosómico al sitio peptidil después de la formación del enlace peptídico, con la eliminación concomitante del tRNA desacilado, el avance del mRNA por un codón y la exposición del siguiente codón. Por lo tanto, la mutación de EFG1 puede causar deficiencia de la traducción mitocondrial y la función mitocondrial, lo que resulta en una enfermedad mitocondrial. Sin embargo, se desconoce cómo el agotamiento de EFG1 afecta la función de células específicas, cómo conduce a disfunciones específicas de órganos y cómo conduce a los diferentes fenotipos observados en la enfermedad mitocondrial.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para investigar los mecanismos por los cuales el agotamiento de EFG1 resulta en enfermedad mitocondrial, hemos establecido un modelo celular de enfermedad mitocondrial utilizando iPSC específicas del paciente.

1. Establecer líneas de iPSC específicas del paciente
2. Corregir la mutación GFM1 en el iPSC específico del paciente
3. Examinar la función de las neuronas derivadas de las iPSC específicas del paciente.

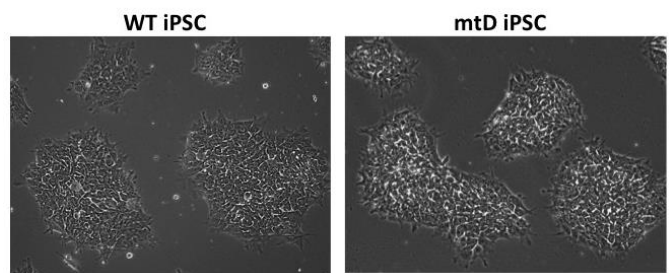
### **RESULTADOS Y ENFOQUE EXPERIMENTAL**

#### **1. Establecer líneas de iPSC específicas del paciente**

Para comprender mejor el mecanismo de la enfermedad mitocondrial, primero establecimos líneas iPSC derivadas de un paciente con enfermedad mitocondrial. Obtuvimos células primarias de fibroblastos establecidas a partir de un control saludable y un paciente con enfermedad mitocondrial que tiene mutaciones en GFM1. Los vectores episomales basados en EBNA-1 / OriP que codifican OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC y p53-shRNA se transfectaron en las células usando nucleofección. Después de la transfección, las células

se colocaron con medio para cultivar células madre embrionarias humanas en una placa matrigel durante 10 días. Luego fueron colocados en la cultura MEF. Las colonias similares a iPSC se seleccionaron a mano y se pasaron en placas MEF. Confirmamos la expresión de genes pluripotentes y la pérdida de los vectores episomales en estas líneas de iPSC. No se observaron diferencias obvias entre el control saludable (WT) y el iPSC de la enfermedad mitocondrial (mtD) en la morfología celular y la tasa de crecimiento (Figura 1).

Figure 1



## 2. Corregir la mutación GFM1 en el iPSC específico del paciente

Una línea celular de control isogénico se puede definir como una línea celular que comparte un genotipo idéntico con la línea celular parental. Los controles isogénicos se establecen típicamente mediante la corrección dirigida de una mutación asociada con las células parentales. Aprovechar los controles isogénicos nos permitiría investigar con precisión el efecto de las mutaciones en las células parentales, una clara ventaja sobre la comparación de líneas celulares derivadas de individuos con diferentes antecedentes genómicos. Para investigar cómo el agotamiento de EFG1 afecta la función de células específicas, generamos un control isogénico utilizando la corrección génica mediada por CRISPR. El iTPCs mtD tiene una mutación heterocigota, c. 2011C> T, p. (Arg671Cys), en el exón 16 del gen GFM1. Diseñamos el sgRNA dirigido solo a la secuencia mutada (Figura 2). Transfectamos el vector de direccionamiento, los vectores de expresión de sgRNA y Cas9 en mtD iPSCs y luego recogimos colonias. A través del proceso de reparación dirigida por homología, obtuvimos los clones de iTPC mtD corregidos (Figura 3).

En la siguiente fase de este proyecto investigaremos si la corrección génica puede restaurar la expresión de EFG1, la traducción mitocondrial, así como la función mitocondrial en las células diferenciadas.

Figure 2

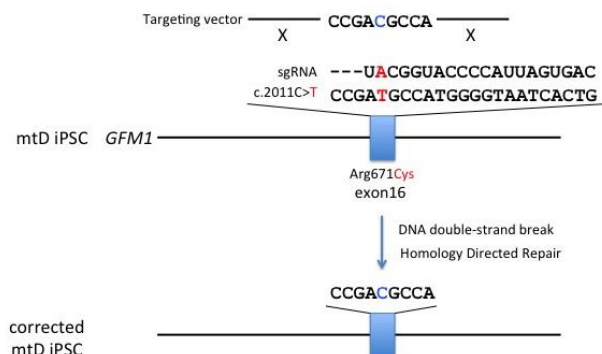
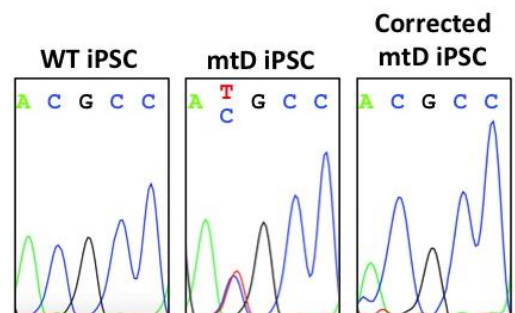


Figure 3



### 3. Examinar la función de las neuronas derivadas de los iPSC específicos de la patente.

Además, probaremos si se pueden rescatar las funciones mitocondriales y las funciones celulares diferenciadas. Para las neuronas, analizaremos la estabilidad celular, la tasa de diferenciación y el sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS). Para las células similares a los hepatocitos generadas in vitro, evaluaremos los niveles de lactato, la actividad de la creatina quinasa y la alanina aminotransferasa dentro de las células o en el medio de cultivo.

#### **PLAN FUTURO**

Los avances recientes en las tecnologías de edición del genoma brindan esperanza sobre cómo apuntar y corregir la mutación genética subyacente en las enfermedades monogénicas. Sin embargo, esas tecnologías implican una integración semialeatoria de los vectores, con un control incompleto sobre el número de copias del transgen, el nivel de expresión, así como el riesgo de mutagénesis por inserción, así como una baja eficiencia. Recientemente, hemos desarrollado una estrategia denominada Inserción Dirigida Independiente de Homología (HITI) basada en el sistema CRISPR / Cas9, que aprovecha los elementos de la vía NHEJ para lograr un efecto selectivo eficiente en células proliferativas y no divisorias. El método HITI puede apuntar específicamente al locus genético asociado a la enfermedad con una frecuencia mínima de inserción / deleción. Además, la tecnología HITI se puede aplicar a la corrección génica en células post-mitóticas in vivo. Para desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las mitocondrias, aplicaremos mejor la tecnología HITI para la selección eficiente de genes in vivo y la corrección de mutaciones del gen *gfm1* en el modelo iPS humano, el modelo iPSC derivado de organoides y el modelo de ratón.

#### **SIGNIFICADO E IMPACTO**

Nuestros datos preliminares han demostrado que HITI es eficaz para la edición del genoma del hígado in vivo e incluso de las células cerebrales que no se dividen. Estos hallazgos respaldan firmemente la hipótesis de que el HITI puede usarse para corregir enfermedades mitocondriales in vivo. La viabilidad de utilizar la tecnología HITI in vivo será beneficiosa para las poblaciones de células madre, como las NSC, que dependen de sus nichos para la autorrenovación. El éxito de este estudio permitirá el uso de HITI para tratar diferentes enfermedades asociadas a las mitocondrias.