



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Edizio genikoan oinarritutako
estrategien garapena intzidentzia
txikiko gibealeko gaixotasunen
tratamendurako: I. motako
hiperoxaluria primarioa**

Miren Barberia

50-57 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.06>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Edizio genikoa oinarritutako garapena intzidentzia txikiko gibleko gaixotasunen tratamendurako: I. motako hiperoxaluria primarioa

Barberia Urteaga M.¹; Zabaleta Lasarte N.¹; Prosper Cardoso F.²; González-Aseguniolaza G.¹ eta Rodríguez-Madoz JR.²

¹*Terapia genikoa eta geneen espresioaren erregulazioa, CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada), Nafarroako Unibertsitatea, Nafarroa*

²*Terapia zelularra programa, CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada), Nafarroako Unibertsitatea, Nafarroa
mbarberiau@unav.es*

Laburpena

I. motako Hiperoxaluria primarioa (PH1), gaixotasun metaboliko autosomiko errezesiboa da, gibleko alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT) entziman sortutako mutazioen ondorioz sortzen dena. Mutazioaren ondorioz, oxalatoaren gehiegizko produkzioa ematen da, kaltzioarekin batzen dena eta kaltzio oxalatoa (CaOx) ematen duena, giltzurrunetan pilatuz eta giltzurrun kalteak eraginez. Tratamendu sendagarri bakarra giltzurrun/gibel transplante konbinatua da. Ikerketa honetan tratamendu alternatibo bat ikertu da, CRISPR-Cas9 sistema erabiliz. Hidroxiazido oxidasa 1 (*Hao1*) genearen espresioa murriztea izan da helburu nagusia, oxalatoaren produkzioa murrizteko. Ikerketa honek *Hao1* genearen espresioa efikazia handiaz murriztea lortu du, gaixotasunaren adierazpen fenotipikoa zuzendua izan delarik.

Hitz gakoak: I. motako hiperoxaluria primarioa, edizio genikoa, CRISPR-Cas9, gibleko gaixotasuna, birus adenoasoziatuak.

Abstract

Primary hyperoxaluria type 1 (PH1) is an autosomal recessive, metabolic disorder caused by mutations in alanine-glyoxylate aminotransferase (AGT) coding gene, an hepatic enzyme involved in the detoxification of glyoxylate. Because of the mutations, the oxalate is overproduced and Calcium Oxalate (CaOx) is synthesized which accumulates in kidneys, leading to kidney damage. The unique curative treatment is the double liver/kidney transplant. In this research, we have analyzed an alternative treatment based on CRISPR-Cas9. The main objective has been to reduce the expression of Hydroxy acid oxidase 1 (Hao1) to reduce the production of oxalate. This investigation has achieved an effective reduction of Hao1 gene expression which corrects the phenotypic expression of the disease.

Keywords: Primary Hyperoxaluria type I, gene editing, CRISPR-Cas9, liver diseases, adeno-associated virus.

1. Sarrera eta motibazioa

I. motako hiperoxaluria primarioa (*ingelesez Primary hyperoxaluria type I, PHI*) gaixotasun arraro bat da, herentzia autosomiko errezesiboa duena eta giblean oxalatoaren gehiegizko produkzioa eragiten duena. PH1, alanina/glioxilato aminotransferasa (AGT) entzimaren ausentziaz, urritasunez edo lokalizazio ezegokiaz sortzen da. Entzima hori peroxisoman aurkitzen da, eta *AGXT* geneak kodifikatzen du (Dutta C, 2016).

Urritasun guzti hauek, oxalatoaren gehiegizko produkzioa eragiten dute. Oxalatoa konposatu oso disolbagaitza da (Cochat P, 2016), organismoak detoxifikatu ezin duena. Hori dela eta,

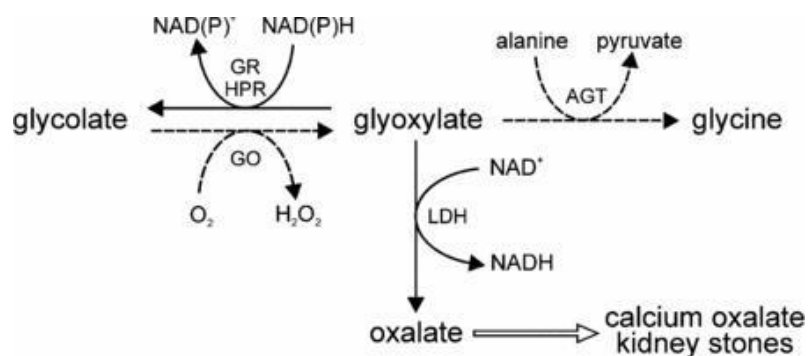
genuaren bitartez kanporatzen da (Lorenzo V, 2014). Oxalatoa kontzentrazio handitan aurkitzen denean, kaltzioarekin elkartzen da, kaltzio oxalatoa (*ingelesez Calcium oxalate, CaOx*) eratu eta giltzurrunetan kalte ezberdinak eraginez, hala nola, nefrolitiasisa, nefrokaltzinosia eta egoera larriagoetan, giltzurrun gutxiegitasuna eta oxalosi sistemikoa (Bhasin B, 2015 eta Cochat P, 2012), tratatu ezean hilkorra dena (Oppici E, 2015).

PH1-ak munduan duen prebalentzia estimatua 1-3 kasu/milioi pertsona artean aurkitzen da (Cochat P, 2016).

Gizakitan, *AGXT* genea, AGT proteina kodetzen duena, 2. kromosoman aurkitzen da. Hamaika exoiek kodetzen dute eta 1,7kb inguruko RNA kodetzen du. AGT entzima, proteina homodimerikoa da eta gibelego zelulen peroxisoman aurkitu behar da funtzionamendu egokirako (Oppici E, 2015 eta Purdue PE, 1990).

Ehun eta berrogeita hamar mutazio baino gehiago deskribatu dira *AGXT* genean. Gaixotasuna 4 mekanismoen bitartez sortzen da: i) lokalizazio mitokondrial aberrantea ii) agregazio proteikoa iii) defektu katalitikoak eta iv) sintesi-defektuak (Leumann E, 2001). AGT entzimaren funtzionamendu ezaren ondorioz, glioxilatoa gibelego zeluletan metatzen da, laktato deshidrogenasa (LDH) entzimaren bitartez oxalatorantz oxidatzen dena, gaixotasunaren agerpena emanez (1.Irudia).

1.Irudia. Glioxilatoaren katabolismoa (Behman et al, 2006)



Tratamenduei dagokionez, oraindik ez da tratamendu estandar eraginkorrik existitzen (Hoppe B, 2006). Konposatu kimikoak erabili dira oxalatoaren disolbagarritasuna emendatzeko, ortofosfatoa kasu (Leumann E, 2001). Bestetik ere, tratamendu biologiko ezberdinak planteatu dira, hala nola, *Oxalobacter formigenes* bakteriararen erabilera. Bakteria honek, oxalatoa energia iturri moduan erabiltzen du, hesteetako oxalatoaren kontzentrazioa murriztuz (Cochat P, 2016).

Tratamendu hauek erabili arren, ez dira espezifikoak eta zenbait kasutan ez dute gaixotasuna hobetzen (Hoppe B, 2006). Azken ikerketei dagokionez terapia genikoa aztertu da tratamendu alternatibo moduan, mutatur dagoen genearen kopia egokia gibelego zeluletara bideratzeko proposatu dena (Salido E, 2011). Horretarako, bektore seguru eta efikaz baten beharra dago, guztien artean, bektore adenoasoziatuak (*ingelesez adeno-associated vector, AAV*) egokienak izan direlarik gaixotasun honen tratamendurako (Cochat P, 2016).

Bektore hauen abantaila, gizakietan gaixotasunetik sortzen ez dutela eta epe luzerako espresioa dutela da, gainera, beste birus batzuek baino erreakzio immunologiko txikiagoa sortarazten dute (Vassalli G, 2003). AAV serotipo ugari existitzen dira eta serotipo bakoitza organo jakin bat infektatzeko tropismo jakina du, birusaren kapsidean agertzen diren proteinen arabera (Verma IM, 2005).

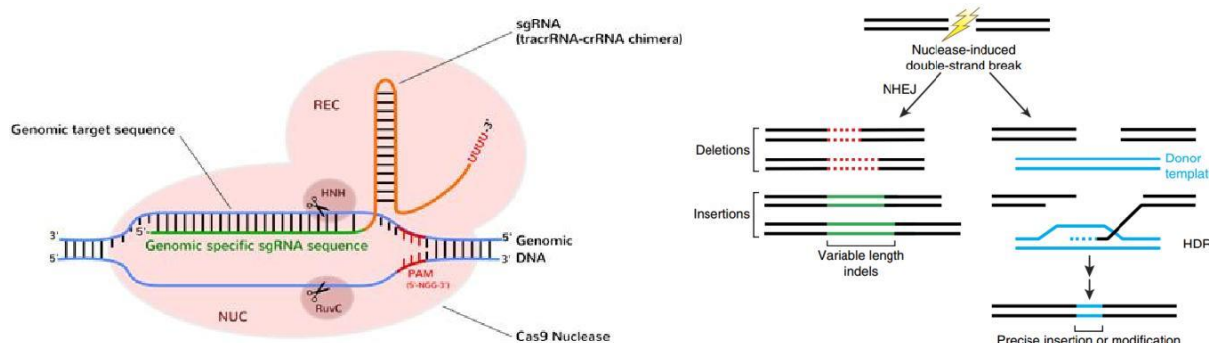
Azken hilabeteetan, estrategia berri bat proposatu da PH1-ren tratamendurako, zeinetan *HAOI* geneak kodifikatzen duen Glikolato Oxidasa (GO) entzimaren aktibitatearen inhibizioan oinarritzen den. GO proteinaren sintesia inhibituz, glioxilatoaren produkzioa murrizten da eta beraz, baita oxalatoaren produkzioa ere, glikolatoaren kontzentrazioa handitzen delarik. Glikolato molekula oso disolbagarria da eta genuaren bitartez kanporatua izan daiteke

kontzentrazio oso handitan, giltzurrunetan kalterik edota bestelako efektu kaltegarriker eragin gabe (1. Irudia) (Martin-Higueras C, 2016).

Datu hauek kontutan hartuz, estrategia berri bat garatu nahi izan da, GO -ren espresioaren isilarazpenean oinarritzen dena.

Azken urteetan, zelularen genoma modu espezifikoan editatzeko tresnak garatu dira. Tresna hauen artean, efikazia handia aurkeztu duena CRISPR-Cas (*Ingelesatik Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat -associated Cas nuclease*) izan da (Qi L, 2013). CRISPR-Cas sistema zenbait bakterio eta arkeoen inmunitate sistema osatzen du. Gida RNA (gRNA) batez eta Cas proteina batez eratuta dago, gRNA-k sekuentzia genomiko jakinak ezagutzen dituelarik eta behin ezagumendua eman delarik, Cas proteinak DNA-n helize bikoitzaren mozketa bat burutzen du. Behin mozketa eman delarik, zelulak duen DNA konponketa mekanismoei esker, mozketa hori bi mekanismoen bitartez konpondu daiteke: alde batetik, NHEJ (*ingelesez, Non-Homologous End-Joining*) eta bestetik, HDR (*ingelesez, Homologous Directed Repair*). NHEJ-ren bitartez, insertzioak eta delezioak (*ingelesez indel-ak*) sortzen dira gidak ezagutu dituen genoma sekuentzia jakinetan eta azken hauek, proteina modu egokian espresatzea ekiditen dute, kodoi irakurketa aldatzen dutelako (Bhaya D, 2011) (2.Irudia).

2.Irudia. CRISPR-Cas9 endonukleasa modifikatua gRNA espezifikoarekin programatua eta DNA konponketa mekanismoak (NHEJ eta HDR). A)DNA sekuentziaren ezagumendua gRNA-ren bitartez. <http://www.ozbiosciences.com/>. B) konponketa mekanismoak (Nature Biotechnology, 2013).



Beraz guzti hau kontutan izanik, estrategia berri baten garapena proposatu da. Terapia genikoa tradizionala erabiliz, gibleko zelulak infektatu nahi izan dira, eta bertan CRISPR-Cas9 sistema espresatzeko *mHao1* (*ingelesez mouse Hao1*) genearen sekuentzia genomikoaren aurka, GO proteinaren espresioa murrizteko eta oxalatoaren produkzioa murrizteko. Horretarako, serotipo 8-dun AAV bat erabiliko da, diseinatutako gida RNA eta Cas9 endonukleasa eramango duena.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa zientifiko honen helburua edizio genikoan oinarritutako tekniken garapena da, estrategia berriak garatu ahal izateko I.motako Hiperoxaluria Primarioaren tratamen durako. CRISPR-Cas9 sistemaren bitartez, *in vivo* PH1 saguen gibleko GO entzimaren produkzioa murriztea edo blokeatzea da helburu nagusia, glioxilatoaren produkzioa murriztu ahal izateko eta ondorioz oxalatoaren erapena eta metaketa murrizteko.

Helburu hori lortzeko, hurrengo azpi-helburuak planteatzen dira:

- 1) *Staphylococcus aureus*-aren (*S. aureus*) CRISPR-Cas9 sistema espresatzen duen AAV bektore batean, *Hao1* sekuentzia kodifikatzailearen aurkako RNA gidan diseinua eta bektorearen produkzioa.
- 2) Mozketa eta edizio genikoaren efizientziaren analisia *in vivo* eta ebaluazioa *mHao1* genean eta bere efektua proteinaren espresioan.

- 3) Edizio genikoaren efektu terapeutikoaren ebaluazioa *in vivo*, ahotik etilenglikol (EG) gainkarga eman ostean.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa honetan, esan bezala, terapia genikoa eta edizio genikoaren konbinaketaren efizientzia aztertu nahi izan zen, PH1-rentzat tratamendu alternatibo bat aurkitzeko.

Esperimentua burutu ahal izateko, 4 talde ezberdinetan banatu ziren PH1 saguak. Kontrol moduan, Wild Type (WT) sagu normalak (gaixotasunarik gabekoak) erabili ziren ere. PH1 animalien kasuan, bi kontrol ezarri ziren, PBS (birusarik ez zeraman taldea) eta AAV8.SaCas9 (gidarik gabeko birusa zeraman taldea). Beste bi taldeak, benchling programa (www.benchling.com) bitartez diseinatutako bi gida ezberdinak (gRNA1 eta gRNA2) zeramatzen birusen efizientzia konparatzeko banatu ziren. Eraturako taldeak hurrengo eskeman laburtzen dira (1.Taula):

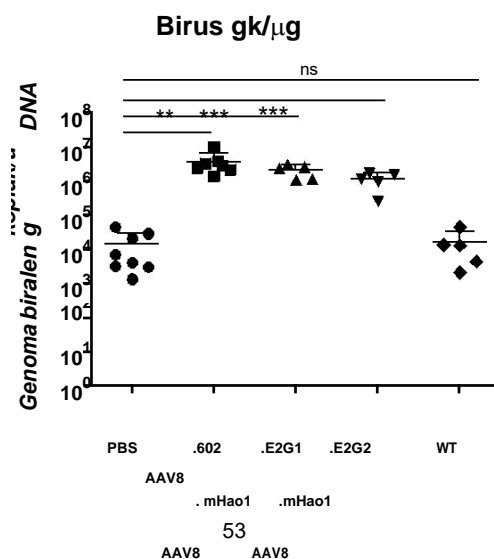
1.Taula. Animalien taldekatzea, animali kopurua, tratamendua eta AAV dosia (genoma biralak/animaliako, gb/animaliako).

Taldea	Animalia	Animali kopurua	Tratamendua	Dosia (gb/animaliako)
1	AgxtKO (PH1)	8	PBS (Phosphate Buffered Saline)	-
2	AgxtKO (PH1)	7	AAV8.SaCas9	1x10 ¹¹
3	AgxtKO (PH1)	5	AAV8.SaCas9.ex2.gRNA1	1x10 ¹¹
4	AgxtKO (PH1)	5	AAV8.SaCas9.ex2.gRNA2	1x10 ¹¹
5	WT	5	-	-

Behin birusak sintetizatuak izan zirela, saguei injektatu aurretik, gernu basala hartu zitzairen. Ondoren birusak intrabenosoki injektatu zitzairen, 21 egun itxaron zirelarik birusak gibelesko zelulen gehiengoaren infekzioa lortzeko. Behin 21 egun igarota, saguei etilenglikol (EG) konposatua ematen hasi zitzairen, edateko uran %0,5-eko kontzentrazioan aste batez. EG konposatuak, oxalatoaren bide metabolikoa gainkargatzen du, oxalatoaren produkzioa areagotuz. Bitartean, 3. eta 7. egunetan, gernuko oxalato balioak neurtu ziren, gainkarga eman bitartean tratamenduaren eragina aztertu ahal izateko. EG-a aste batez eman ondoren saguak hil eta gibela erauzi ostean, analisi ezberdinak burutu ziren.

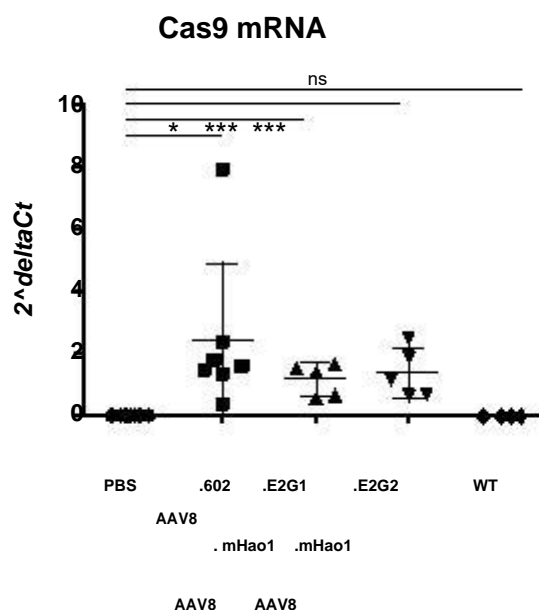
Hasteko, infekzioa modu egokian eman zela ziurtatzeko, gibelesko zeluletan zeuden genoma biralen presentzia aztertu zen, birus genoma kopiak µg DNA-ko (gk/ µg) analizatuz. 3. irudian aztertu daitekeen moduan, infekzioa modu egokian eman zen birusak injektatu ziren taldeetan, genoma biralen presentzian ezberdintasun adierazgarriak ikusi zirelarik PBS animaliekin konparatuz (p<0.01 (**)) eta p<0.001 (***), ns: ez adierazgarria).

3. Irudia. Genoma biralen kuantifikazioa gibelesko zeluletan, AAV-arekin tratatutako saguetan eta kontrol saguetan.



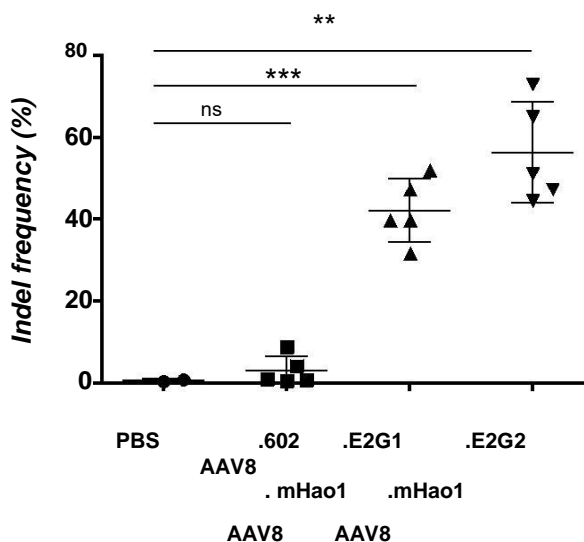
Behin infekzioa modu egokian eman zela ikusita, birusak Cas9 endonukleasaren espresioa burutzen duen edo ez aztertu zen. Horretarako Cas9 proteinaren mRNA-ren presentzia aztertu zen. 4. irudian aztertu daitekeen moduan, birusekin infektatutako sagu talde guztietan Cas9 mRNA-ren presentzia estatistikoki adierazgarria izan zen, birusak geneen transdukzioa modu egokian burutu zuelarik ($p < 0.1$ (*), $p < 0.01$ (**), eta $p < 0.001$ (***)). ns: ez adierazgarria).

4. Irudia. Cas9 proteinaren espresioaren analisia mRNA-ren adierazpenaren bitartez gibelesko zeluletan.



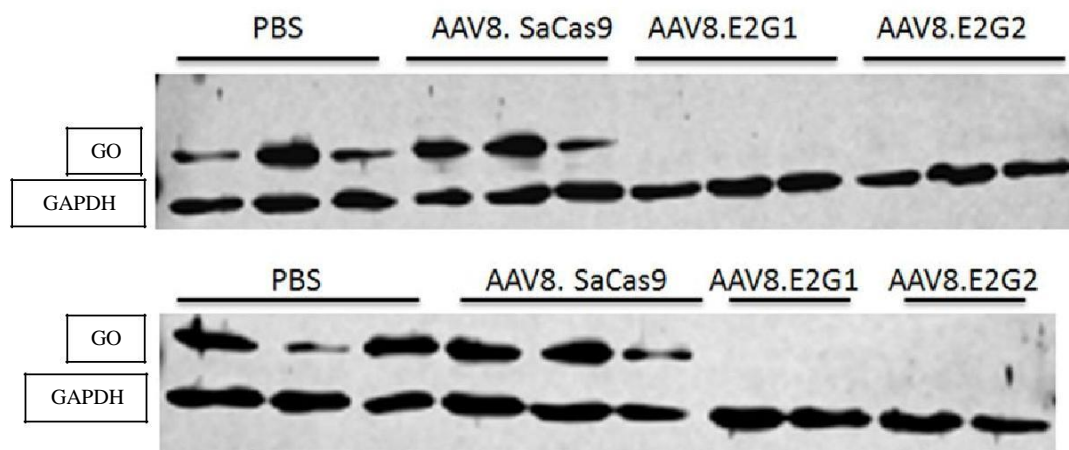
Cas9 proteinaren espresioa baieztatuta, *mHao1* geneen sortutako *indel*-en frekuentzia aztertu zen. Horretarako, gibelesko zelulen DNA erazita, sekuentziatzen bidali zen. Behin sekuentziak edukita, TIDE programa (www.tide.nki.nl) erabiliz, sekuentziak konparatuak izan ziren. 5. irudian ikus daitekeen moduan, gidak erabili ziren taldeen kasuan, *indel*-en frekuentzia estatistikoki adierazgarria izan zen PBS taldearekin konparatuz gero, gidak DNA-n mozketan eratu zuelarik ($p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)). ns: ez adierazgarria).

5. Irudia. Indel-en frekuentziaren analisia talde ezberdinetan



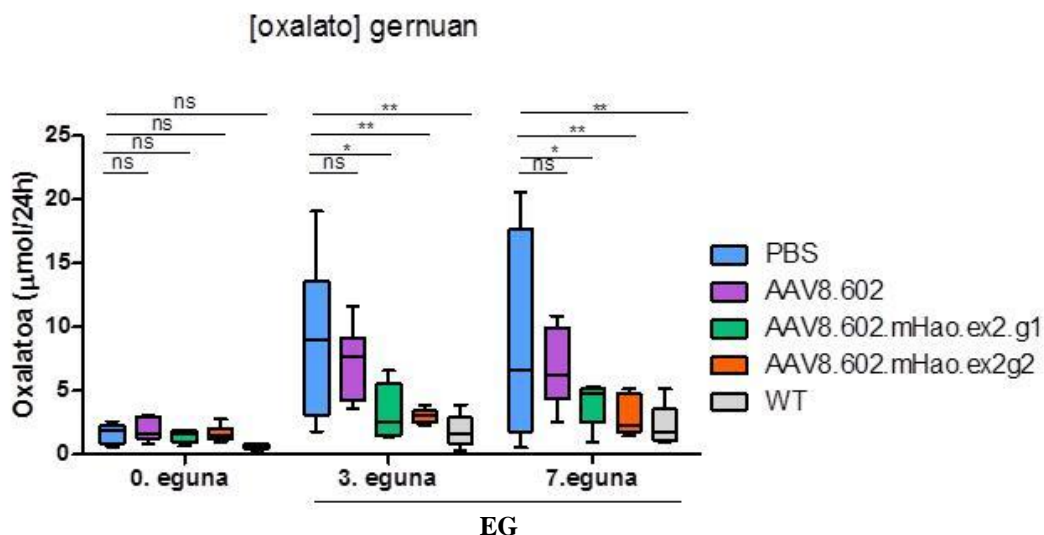
Indel-ak eratu zirela konfirmatuta, GO proteinaren espresioa Western blot bitartez aztertua izan zen, GO proteinaren murrizpena konfirmatzeko. Gidak erabili ziren bi taldeetan, GO proteinaren sintesiaren murrizpen argia lortu zen, sortutako *indel*-en ondoriozkoa izan zelarik (6. Irudia).

6.Irudia. Go proteinaren espresioaren analisia Western blot bitartez (AAV8.E2G1=AAV8.ex2gRNA1; AAV8.E2G2=AAV8.ex2gRNA2).



Azkenik, tratamenduak zuzenketa fenotipikoa izan duen ikusi ahal izateko, oxalatoaren kontzentrazioaren determinazioa burutu zen saguen gernuan. Gernuetako oxalatoaren balio basalak berdintsuak izan ziren PH1 eta WT animalien kasuan. Behin EG-a ematen hasi zitzairenean, talde guztiek oxalatoaren eskrezioan emendapen bat azaldu zuten, oxalatoaren bide metabolikoaren gainkarga zela eta. Hala ere, gidekin tratatutako saguen kasuan, oxalatoaren eskrezioa murriztagoa izan zen 3. eta 7. egunetan PBS taldearekin konparatuz gero,emaitzak estatistikoki adierazgarriak izan zirelarik ($p < 0.01$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)), ns: ez adierazgarria) (7. Irudia).

7.Irudia. Gernuko oxalato kontzentrazioaren neurpena talde eta egun ezberdinetan.



4. Ondorioak

Aurkeztutako lanetik hainbat ondorio atera daitezke. Lehenik eta behin, terapia genikoaren efizientzia altua dela. Gibelesko zelula proportzio handia infektatzea lortu da. Bestetik edizio genikoaren efizientzia oso altua izan da. Diseinatutako gidek, GO sekuentzia genomikoa eraturako indelen %-a nahikoa izan da GO proteina kantitatearen murrizpena ikusi ahal izateko eta honekin batera, tratamenduaren efektu terapeutikoa ikusi ahal izateko, gernuko oxalato kontzentrazioaren murrizpena eman baita. Beraz, tratamendu alternatibo on baten aurrean egon gaitzke, nahiz eta ikerketa gehiago behar dituen esperimentu honek.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta, oraindik badira zenbait puntu analizatzeko daudenak. Hala nola, gibelesko eta giltzurrunetako histologia aztertu beharra dago. Izan ere, giltzurrunetan pilatzen den CaOx analizatzea egokia izango litzateke, gaixotasunaren ondorio bat delako. Bestetik ere, CRISPR-Cas sistemak denbora luzean duen eragina ere aztertzea komenigarria litzateke, ondorio kaltegarriren bat ote duen ikusteko, etengabe espresatzen baitago. Azkenik, metodoaren segurtasuna dela eta, bestelako organo eta ehunetan CRISPR-Cas sistema espresatzen den edo ez aztertu beharko litzateke, gibela ez den beste ehunetan espresatzen eta eraginik (*Off-target*-ak) ditugun edo ez ziurtatzeko.

6. Erreferentziak

Bhasin B, Urekli HM, Atta MG. (2015): Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J Nephrol.*, 235-44.

Bhaya D, Davison M, Barrangou R. (2011): CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.*;45:273-97.

Cochat P, Hulton SA, Acquaviva C, Danpure CJ, Daudon M, De Marchi M, et al. (2012): Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant.*, 27(5):1729-36.

Cochat P, Rumsby G. (2016) Primary Hyperoxaluria. *N Engl J Med.*, 369(7):649-58.

Dutta C, Avitahl-Curtis N, Pursell N, Larsson Cohen M, Holmes B, Diwanji R, et al. (2016): Inhibition of Glycolate Oxidase With Dicer-substrate siRNA Reduces Calcium Oxalate Deposition in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type 1. *Mol Ther.*, 24(4):770-8.

Hoppe B, Beck B, Gatter N, von Unruh G, Tischer A, Hesse A, et al. (2006): Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.*,70(7):1305-11.

Leumann E, Hoppe B. (2001): The primary hyperoxalurias. *J Am Soc Nephrol.*, 12(9):1986-93.

Lorenzo V, Torres A, Salido E. (2014): Primary hyperoxaluria. *Nefrologia.*, 34(3):398-412

Martin-Higueras C, Luis-Lima S, Salido E. (2016): Glycolate Oxidase Is a Safe and Efficient Target for Substrate Reduction Therapy in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type I. *Mol Ther.*,24(4):719-25.

Oppici E, Montioli R, Cellini B. (2015): Liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase and the effects of mutations associated with Primary Hyperoxaluria Type I: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.*, 1854(9):1212-9.

Purdue PE, Takada Y, Danpure CJ. (1990): Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine:glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.*,111(6 Pt 1):2341-51.

Qi L, Larson M, Gilbert L, Doudna J, Weissman J, Arkin A, et al. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell.*, 152(5):1173-83.

Salido E, Rodriguez-Pena M, Santana A, Beattie SG, Petry H, Torres A.(2011): Phenotypic correction of a mouse model for primary hyperoxaluria with adeno-associated virus gene transfer. *Mol Ther.*, 19(5):870-5

Vassalli G, Büeler H, Dudler J, von Segesser LK, Kappenberger L. (2003): Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol.*,90(2-3):229-38.

Verma IM, Weitzman MD.(2005): Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.*, 74:711-38.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi nituzke batez ere Nereari, bere tesian tartetxo bat edukitzen uzteagatik, pazientziagatik eta irakatsi didan guztiagatik, etorkizunean oso baliogarria izango baitzaidalako.

Bestetik Gloriari, bere laborategian hartu izanagatik, hasieratik nigan konfiantza izateagatik eta aukera on hau emateagatik. Baita Juanrori, gainean egoteagatik eta emandako irakaspenagatik.