



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

# I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15  
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

## OSASUNA

**Terapia genikoaren erabilera.  
Lehen motako hiperoxaluria  
primarioa (PH1) tratatzeko**

*N. Zabaleta, D. Salas, J. López,  
E. Salido eta  
G. González-Aseguinolaza*

790-795 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.110>

ANTOLATZAILEA:



udako  
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA  
GOBIERNO VASCO



Bizkaiko Foru Aldundia  
Diputación Foral de Bizkaia



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Universidad de Deusto  
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON  
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



UPNA  
Universidad  
Pública de Navarra  
Nafarroako  
Unibertsitate Publikoa

## Terapia genikoaren erabilera lehen motako hiperoksaluria primarioa (PH1) tratatzeko

Zabaleta N (1), Salas D (1), López J (1), Salido E (2), González-Aseguinolaza G (1)  
*Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Programa de Terapia génica y Regulación de la expresión génica, Universidad de Navarra, Iruña, Espainia (1), Hospital Universitario de Canarias, Departamento de Patología, Universidad de La Laguna, Tenerife, Espainia (2).*  
nzabaleta@alumni.unav.es

### Laburpena

Lehen motako Hiperoksaluria Primarioa (PH1) oinarri genetiko duen gaixotasun arraro bat da. PH1 gaixoei AGXT izeneko genean mutazioak dituzte, eta ondorioz, gibelean alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT) izeneko entzima falta zaie. Gabezia honen ondorioz oxalato izeneko metabolito bat kontrolik gabe ekoizten da eta ehunetan metatzen denean minak eragiten ditu, batez ere giltzurrunetan. Terapia genikoan erabiltzen diren birusen bitartez gaixo hauek gibelean entzimaren aktibitatea berreskura lezakete. Lan honetan terapia genikoaren erakortasuna ikertzeko erabilgarria den animalia eredu bat sortu dugu.

Hitz gakoak: hiperoksaluria, L-hidroxi-prolina, *Macaca fascicularis*, birus adenoasoziatuak

### Abstract

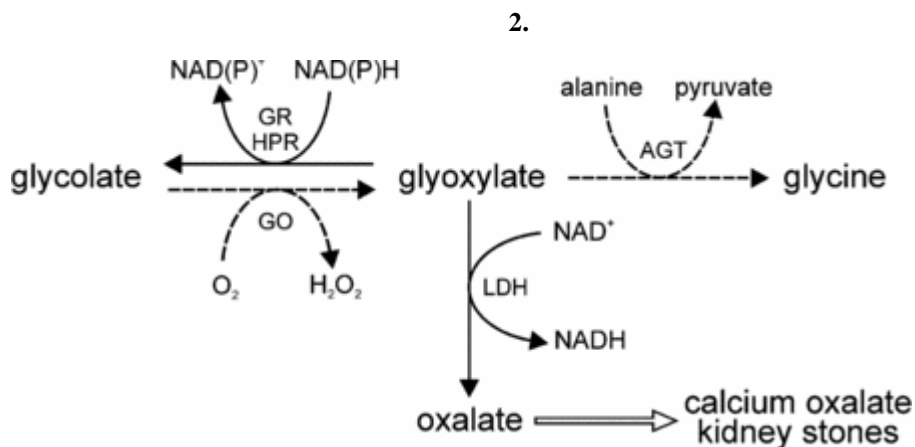
*Primary Hyperoxaluria type I (PH1) is a rare disease that has a genetic origin. Patients with PH1 show mutations in AGXT gene, and therefore, they lack of alanine-glyoxilate aminotransferase (AGT) enzyme in the liver. The absence of the enzyme causes the overproduction of a metabolite called oxalate, which is accumulated in the tissues and causes injury, mainly in the kidneys. The activity of the enzyme could be restored using viral vectors in gene therapy strategies. In this work, we had developed an animal model for the study of the efficacy of gene therapy.*

*Keywords: hyperoxaluria, L-hydroxyproline, Macaca fascicularis, adenoassociated viruses*

### 1. Sarrera eta motibazioa

Lehen motako Hiperoksaluria Primarioa (ingelesez *Primary Hyperoxaluria type I* edo PH1) gaixotasun arraro kontsideratzen da populazioan dagoen gaixo urritasuna dela eta: gutxi gorabehera milioi bat biztanleko 1-3 pertsonak jasaten dute. Gainera, herentzia genetikoan transmititzen den gaixotasuna da, konkretuki gaixotasun autosomiko errezesiboa. PH1 gaixoei alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT) izeneko entzimaren ekoizpenean arazoak dituzte AGXT geneko mutazio ezberdinak direla eta (Hoppe et al, 2009). AGT entzimak glioxilatoa erabiltzen du gibelean glizina aminoazidoa sortu ahal izateko eta bere funtzioak betetzen ez dituztenean glioxilatotik glikolatoa eta oxalatoa ekoizten dira (1.irudia).

## 1. irudia. Glioxilatoaren katabolismoa (Behman et al, 2006)



PH1 gaixotasuna haurtzaroan eta gaztaroan diagnostikatzen da kasu gehienetan, giltzurrunean agertzen diren minen ondorioz. Gaixoek urolitiasia (harrien presentzia giltzurrunetan), nefrokaltzinosisia (oxalato kaltziko deposituen agerpena giltzurrunetan) eta giltzurruneko gutxiegitasun kronikoa garatzen dute urte gutxitan gaixotasuna agertu ondotik. Sintoma hauek guztiak oxalatoari dagozkio: AGT entzimaren faltaren ondorioz oxalato kopuru handiak sortzen dira gibelean eta hauek giltzurrunaren bidez kanporatzen dira gorputzetik. Oxalato kopurua handiegi denean, giltzurruneko tubuluetan hauspeatu egiten da eta oxalato kaltziko bilakatzen da, zein giltzurrunetan pilatzen den kaltea eraginez (Hoppe et al, 2009).

Oxalatoa ezin da modu egokian kanporatu giltzurruneko gutxiegitasuna garatzen denean eta odol zirkulazioan bere kontzentrazioa areagotzen da. Ondoren, oxalatoa beste organo batzuetan depositatzen da, mina eraginez. Adibidez, erretina, bihotza eta odol hodiak, azala, hezurak eta sistema nerbioso zentrala dira organo eraginenak (Hoppe et al, 2009). Tratamendurik eman ezean gaixoak heriotzara hel daitezke gaixotasunari dagokiola eta.

Gaur egun, PH1 gaixotasunaren tratamendu sendagarri bakarria gibelaren transplantea da; gainera askotan giltzurrun transplantea ere beharrezko izaten da giltzurruneko gutxiegitasun kronikoaren ondorioz. Hala eta guztiz ere, transplanteak arazoa asko dakar: emaile urritasuna, immunosupresio tratamendu bizi guztirako eta hilkortasun handia (Lorenzo et al, 2014).

Gene transferentzia somatikoak zenbait abantaila suposatu ditzake PH1 gaixotasuna tratatzeko. Gaixoen gibelean arazo bakarria glioxilatoaren detoxifikazioa da eta hori zuzenduz gero giltzurrunak ez lirakeke minduko. Terapia genikoaren bitartez AGXT gene funtzionala eraman liteke gibel gaixoetara eta nahiko hepatozitotara iritsiz gero oxalato ekoizpena murriztuko litzateke, gaixoaren sintomekin batera.

Terapia genikoan erabiltzen den bektore biraletako batzuk birus adenoasoziatu errekonbinanteak dira (ingelesez *recombinant adeno-associated virus* edo rAAV). Birus hauek hari bakarreko DNA duten AAV birusen manipulazio genetikotik heldu dira. AAV birusak dependobirus generokoak dira eta Parvoviridae familiaren barne daude. *Wild type* (WT) birusek ezin dute beraien kabuz erreplikatu, beste birus baten koinfekzioaren beharra dute, adibidez adenobirusa (Wu et al, 2006). Beraien erabilerak zenbait abantaila suposatzen ditu terapia genikorako. Lehenik, AAV birusek ez dute gaixotasunik sortzen pertsonengan, beraz beste birus errekonbinante batzuk baino seguruagoak izan litezke. Bestalde, laborategiko animalia modelotan ikusi da rAAVa gai dela geneak denbora luzez ekoizteko, beraz pazienteetan ez litzateke rAAV dosi asko eman beharrik. Azkenik, AAV birusetan 10 serotipo ezberdin aurkitu dira urteetan zehar eta serotipo horietako batzuk gibelarekiko preferentzia dute (gibelarekiko tropismoa), beraz gibela infektatzen dute beste organo batzuek baino lehen. Gibelarekiko

tropismoa duten birusen artean AAV5 eta AAV8 serotipoak dauzkagu, eta PH1 gaixoen tratamendurako baliagarriak izan daitezke.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

### 2.1 Arloko egoera

PH1 sagu modelo bat sortu da gaixotasuna ikertu ahal izateko. Sagu hauek *knock out* (KO) dira AGXT generako, gaixoei bezala ez dute AGT proteina funtzionalik eta antzeko sintomatologia garatzen dute: oxalato sintesi eta gernuan kanporatze handiagoa, urolitiasia, nefrokaltzinosia eta giltzurruneko gutxiegitasuna. Salido-ren (2011) artikuluan azaltzen den bezala, sagu hauek rAAV5-hAGXT birusaren (giza AGT proteina ekoizten duen 5 serotipoko birusa) dosi desberdinekin tratatu ziren. Autoreek ikusi zuten bi hilabetetan zehar saguen oxaluria (oxalatu presentzia gernuan) jaitsi egiten zela, beraz, birusaren efektua positiboa da. Gainera, saguen gibeletan AGT entzimaren aktibitatea berresuratzea lortu zuten animalia gaixoetan. Esperimentu hauek frogatzen dute AAV5 birusa hepatozito askotara iritsi daitekeela eta PH1 gaixoentzat etorkizun handiko tratamendu bat izan daitekeela.

### 2.2 Ikerketaren helburuak

- AAV5-AGXT birusaren produkzioa eta karakterizazioa: birusaren funtzionalitatea aztertu beharra da.
- Birusaren denbora luzeko efikaziaren analisia KO sagu modeloan, non *Macaca fascicularis* primateetan erabiliko den dosia determinatuko den.
- Segurtasun, tolerantzia maila eta efikazia ikerketa *Macaca fascicularis* primateetan.

## 3. Ikerketaren muina

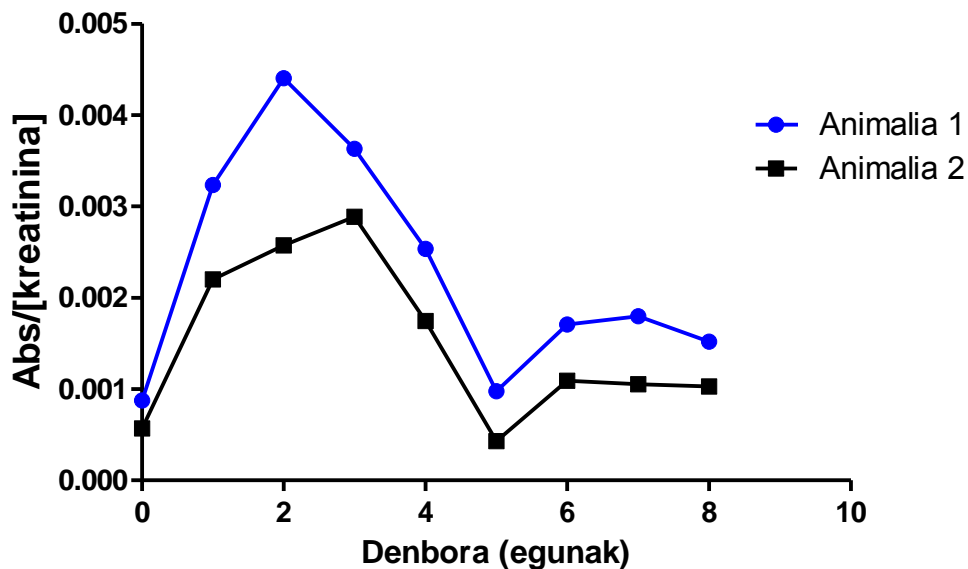
Artikulu honetan hirugarren helburuari dagokion ikerlana azalduko dugu: *Macaca fascicularis* espeziean egindako ikerketa.

Esan bezala, rAAV5-hAGXT birusaren segurtasuna eta efikazia frogatu nahi dira, etorkizunean PH1 gaixoei tratatu ahal izateko. Horretarako, oso garrantzitsua da filogenetikoki gizakiarengatik gertu dagoen espezie batean birusaren eragina aztertzea, eta guk *Macaca fascicularis* primate espeziea erabili dugu.

Birusaren segurtasuna frogatzeko toxikotasun frogak egin beharra dira infektatutako animalietan. Arazoa birusaren efikazia frogatzea da, AGXT genearentzako KO diren makakoak ezin direlako sortu. Bestalde, hiperoxaluria eragin dezakegu oxalatoaren aintzindari metaboliko bat animaliei administratuz gero, adibidez L-hidroxiprolina (HP). WT saguetan frogatua dago HParen ahozko administrazioak oxalato kopurua areagotzen duela gernuan eta administrazio askoren ondoren giltzurrunetan mina aurkitu daiteke du (Knight J et al, 2012). Beraz, makakoei HP administratzea hautatu genuen.

Konkretuki, gure ikerlanean oxalato igoera iragankorra lortu nahi dugu, beraz 2 makakori HPa eman diegu (beraien pisuaren %1) ahozko administrazio bidez hiru egunetan zehar (dosi bat eguneko). Animalien gernua bildu da (3 orduko gernua) eta oxalato presentzia aztertu da.

2. irudia. Oxalato analisia bi makakoen gernetan esperimentuan zehar. Oxalato determinazio frogak ematen duen absorbantzia gernetu kreatinina kontzentrazioarekin normalizatu irudikatu da denboran zehar.

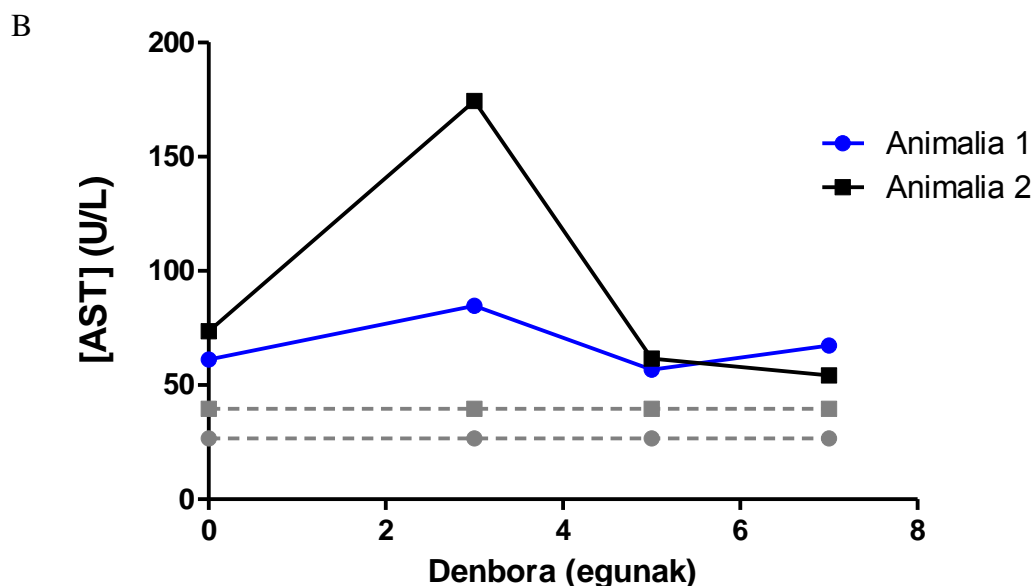
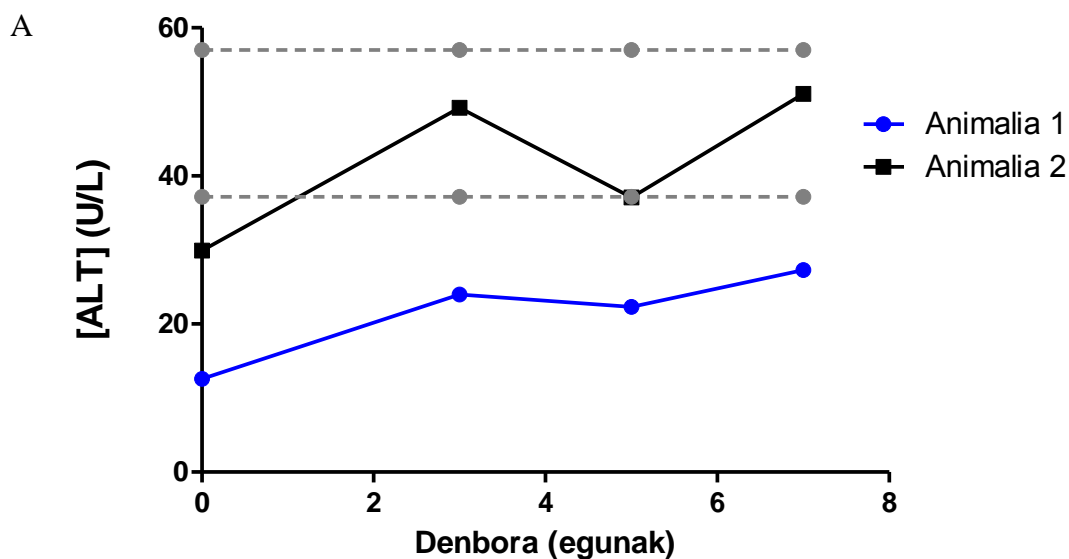


Bigarren irudian ikus daiteke nola aldatzen den bi makakoen oxalato kopurua denboran zehar. HP administratu ondoren (0 eguna) oxalato kopuru igoera nabaria ikusi genuen eta mantendu egin zen azken administrazioa eman arte. Ondoren jaitsiera nabaria ematen da balio normalak berreskuratu arte.

Bestalde, animalien sueroa lortu dugu esperimentuan zehar eta hainbat analisi biokimikoren ondoren aurkitu dugun gauza bakarra transaminasetan igoera txikia da. Hirugarren irudian azaltzen den bezala, alanina-transaminasa (ALT) eta aspartato-transaminasa (AST) parametroen igoera ematen da HPa administratu zaien animalietan. ALTA esperimentuan zehar igotzen doa eta ASTak piko bat egiten du hirugarren egunean. Emaitza hauek espera genitzakeen, transaminasak gibelaren aktibitatea aztertzeko erabiltzen dira eta posible da HP guztia metabolizatzean gibelak sufritu izana.

Gainontzekoz, animaliek ez dute konplikaziorik eduki eta egoera normalera itzuli dira.

3. irudia. Sueroko alanina-transamina (A) eta aspartato-transamina (B) mailen kuantifikazioa denboran zehar.



#### 4. Ondorioak

Aurkeztutako lanetik hainbat ondorio atera daitezke. Lehenik, L-hidroxi-prolinaren administrazioak hiperoxaluria sortzen duela makako arruntetan. Bestetik, makakoaren %1eko pisuari dagokion HP administrazioak denbora laburrean ez diola animaliari kalterik egiten, transminasen igoera labur bat izan ezik. Azkenik, esperimentu honetan hiperoxaluria modelo bat sortu dugu *Macaca fascicularis* espeziean, zein rAAV5-hAGTX bektorearen efikazia ikasteko erabiliko den.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean rAAV5-hAGXT birusa sortuko dugu eta bere infektatzeko gaitasuna eta efikazia aztertuko ditugu KO sagu modeloan. Ondoren, birusa *Macaca fascicularis* espeziean frogatuko dugu, non toxikotasuna aztertuko dugun. Makakoetan efikazia aztertzeko birusa

administratu ondoren hiperoxaluria eragingo diegu animaliei L-hidroxi prolina emanez. Birusa funtzionatzen ari bada, oxaluria pikoa baxuagoa izatea espero dugu.

## 6. Erreferentziak

Behnam J.T., Williams E.L., Brink S., Rumsby G. eta Danpure C.J. (2006): Reconstruction of human hepatocyte glyoxylate metabolic pathways in stably transformed Chinese-hamster ovary cells, *Biochem. J.*, 394: 409–416.

Hoppe B., Beck B.B. eta Milliner D.S. (2009): The primary hyperoxalurias, *Kidney International*, 75: 1264–1271.

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

Knight J., Holmes R.P., Cramer S.D., Takayama T. eta Salido E. (2012): Hydroxyproline metabolism in mouse models of primary hyperoxaluria, *Am J Physiol Renal Physiol.*, 302: 688-693.

Salido E., Rodriguez-Pena M., Santana A., Beattie S.G., Petry H. eta Torres A. (2011): Phenotypic Correction of a Mouse Model for Primary Hyperoxaluria With Adeno-associated Virus Gene Transfer, *The American Society of Gene & Cell Therapy*, 5: 870–875.

Wu Z., Asokan A., and Samulski R.J. (2006): Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy, *Molecular therapy*, 14: 316- 327.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiet lan honetan parte hartu duten autore guziei beraien lanagatik. Bestalde, *The Oxalosis & Hyperoxaluria Foundation* fundazioari proiektua finantzatzeagatik.