

**Título:** GENE EDITING AND HEPATIC DIRECT CELL REPROGRAMMING FOR THE TREATMENT OF PRIMARY HYPEROXALURIA TYPE 1

**Nombre:** Nieto Romero, Virginia

**Universidad:** Universidad Autónoma de Madrid

**Departamento:** Biología molecular

**Fecha de lectura:** 10/12/2021

**Mención a doctor europeo:** concedido

**Programa de doctorado:** Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid

**Dirección:**

> **Director:** JOSÉ CARLOS SEGOVIA SANZ

> **Codirector:** MARÍA GARCÍA BRAVO

**Tribunal:**

> **presidente:** EDUARDO SALIDO RUIZ

> **secretario:** BELEN PÉREZ GONZALEZ

> **vocal:** MARÍA ISABEL FABREGAT ROMERO

> **vocal:** LLUIS MONTOLIU JOSE

> **vocal:** Nerea Zabaleta Lasarte

**Descriptores:**

> INGENIERIA GENETICA

> BIOLOGIA CELULAR

> CULTIVO CELULAR

**El fichero de tesis** ya ha sido incorporado al sistema

> <http://hdl.handle.net/10486/700921>

**Resumen:** La hiperoxaluria primaria tipo 1 (HP1) es una enfermedad hepática metabólica rara de herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen AGXT, que codifica para la enzima de los peroxisomas hepáticos alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT). Esta enzima cataliza la conversión de glioxilato a glicina en el hígado. Debido a la deficiencia en la enzima AGT, el exceso de glioxilato generado es convertido a oxalato por la enzima lactato deshidrogenasa. El oxalato es un producto final del metabolismo que no puede ser metabolizado por los mamíferos y es excretado por la orina. El exceso de oxalato conduce a la formación de cristales de oxalato cálcico insolubles que se acumulan principalmente en el riñón, provocando daño renal progresivo, y también en otros tejidos, conduciendo a oxalosis sistémica. Actualmente, el único tratamiento curativo que existe para esta enfermedad es el trasplante combinado de riñón e hígado. Sin embargo, a la

escasez de hígados donantes se le suma que estos pacientes deben estar bajo tratamiento inmunosupresor durante toda su vida. Por ello, se necesita el desarrollo de tratamientos terapéuticos alternativos. En esta Tesis Doctoral, exploramos la posibilidad de corregir fibroblastos derivados de biopsias dérmicas de pacientes HP1 mediante edición génica, seguida de reprogramación celular directa para generar hepatocitos inducidos sanos autólogos. Se ha llevado a cabo la corrección específica del gen AGXT en el locus endógeno mediante recombinación homóloga asistida por el sistema CRISPR/Cas9, siguiendo dos estrategias diferentes. Por un lado, corregimos de manera precisa la mutación puntual p.L244T del exón 7, la segunda más frecuente en pacientes HP1 y la más abundante en las islas Canarias, donde se ha descrito un efecto fundador. Demostramos la viabilidad de la corrección precisa de esta mutación en fibroblastos derivados de pacientes HP1 mediante electroporación de una ribonucleoproteína (RNP) específica y un oligonucleótido monocatenario con la secuencia correctora. Por otro lado, desarrollamos una estrategia de knock-in aplicable a casi todos los pacientes HP1, con diferentes mutaciones a lo largo de todo el gen AGXT. Esta estrategia consiste en la integración dirigida de una versión mejorada del ADN del gen AGXT (RHEAM) en el codón ATG del locus endógeno. Obtuvimos clones con la integración precisa mediante electroporación de una RNP específica y diferentes plásmidos donadores. Los clones de fibroblastos corregidos para el gen AGXT fueron reprogramados directamente a hepatocitos inducidos mediante transducción lentiviral de cuatro factores de transcripción hepáticos: FOXA2, HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  y TBX3, en paralelo a sus correspondientes líneas de pacientes HP1 no corregidas y a líneas celulares de donantes sanos. Los hepatocitos inducidos generados expresaban genes hepáticos implicados en diferentes funciones del hígado y acumulaban glucógeno. Se ha demostrado la reversión de la acumulación de oxalato in vitro en los hepatocitos inducidos corregidos para el gen AGTX, en línea con la inducción de la expresión de AGXT, en comparación con los hepatocitos inducidos sin corregir de pacientes HP1. Nuestros resultados indican que la corrección en homocigosis mediante knock-in de la versión mejorada RHEAM es la mejor opción para la reversión de la acumulación patológica de oxalato en hepatocitos inducidos editados genéticamente. Este trabajo demuestra que la generación de hepatocitos inducidos con capacidad de metabolizar el glioxilato in vitro, mediante corrección específica del gen AGXT y reprogramación celular hepática directa, es viable a partir de fibroblastos derivados de pacientes HP1. Este producto celular tendrá que ser evaluado in vivo para demostrar su potencial como fuente celular alternativa para terapia de reemplazo celular en el tratamiento de la HP1. De manera complementaria, los hepatocitos generados pueden constituir un valioso modelo in vitro de la enfermedad, para el estudio de la misma, así como para la evaluación de otras estrategias terapéuticas.