

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**EDIÇÃO GÊNICA EM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I  
UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR-Cas9**

**Talita Giacomet de Carvalho**

**Orientadora: Prof. Ursula Matte  
Co-orientador: Prof. Guilherme Baldo**

**Porto Alegre, agosto de 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**EDIÇÃO GÊNICA EM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I  
UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR-Cas9**

**Talita Giacomet de Carvalho**

*Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Genética e Biologia Molecular  
da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor.*

**Orientadora: Prof. Ursula Matte  
Co-orientador: Prof. Guilherme Baldo**

**Porto Alegre, agosto de 2016**

## AGRADECIMENTOS

A realização desta tese contou com apoios e incentivos importantes sem os quais não teria acontecido e aos quais sou eternamente grata.

À professora Ursula Matte, pela orientação, pela confiança depositada, por toda a paciência, pela contribuição que tem há anos no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Guilherme Baldo, pela orientação, pelas ideias, por todo o incentivo e empolgação com cada resultado do trabalho, pela amizade.

Aos amigos do Centro de Terapia Gênica, pelo companheirismo, amizade e pela disponibilidade em ajudar que sempre encontro em vocês. Em especial à Rose, pela união nos momentos de desespero; ao Felipe, pelo auxílio nos experimentos; à Gabi, por toda a ajuda; e à Mônica, minha companheira de trajetória acadêmica e de vida. À Bim, minha dupla que continua sempre presente. E à Vales, pela parceria em tantos trabalhos.

Às gurias da URH do Hospital Fêmeina, Fê e Lu, que acompanham a minha trajetória de fim de doutorado desde o ano passado e sempre me incentivam e me acalmam.

Aos amigos de fora do laboratório, que não serão nomeados pois corro risco de esquecer alguém.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e especialmente aos colegas dos outros laboratórios do Centro de Pesquisa Experimental.

À UFRGS e ao PPGBM, em especial ao Elmo, sempre disposto a ajudar a resolver os problemas dos alunos.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto.

À minha família, meus pais e minha irmã, por todo o apoio, incentivo e amor.

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nas Unidades de Experimentação Animal, Centro de Terapia Gênica e Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas. Os recursos financeiros foram obtidos do Edital de Terapias Portadoras de Futuro (CNPq) e do Fundo de Incentivo a Pesquisa (HCPA).

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Doenças Lisossômicas de Depósito.....	13
1.2. Terapia gênica.....	20
1.2.3. Edição gênica .....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral .....	33
3.2. Objetivos específicos .....	33
4. ARTIGOS.....	34
4.1. Artigo I: Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases .....	34
4.2. Artigo II: A simple end efficient protocol for transfecting mesenchymal stem cells.....	42
4.3. Artigo III: Gene editing using the CRISPR-Cas9 system in human MPS I fibroblasts.....	61
4.4. Resultados adicionais: Experimentos em animais .....	81
5. DISCUSSÃO .....	87
6. CONCLUSÕES .....	96
7. REFERÊNCIAS .....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipos de Mucopolissacaridoses, epônimo, substrato armazenado e enzima deficiente.....	15
Tabela 2 Possíveis eventos <i>off-target</i> preditos pelo site <a href="http://crispr.cos.uni-heidelberg.de">http://crispr.cos.uni-heidelberg.de</a> .....	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de degradação do dermatan sulfato e heparan sulfato .....	17
Figura 2. Edição gênica induzida por nuclease.....	24
Figura 3. Especificidade da ligação ao DNA de ZFN e TALEN.....	27
Figura 4: Linha do tempo da evolução das pesquisas em edição gênica e CRISPR.....	28
Figura 5. Sistema CRISPR-Cas9 em bactérias.....	30
Figura 6: Atividade de IDUA.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – DNA complementar

CRISPR – do inglês *clustered regularly interspaced palindromic repeats*

CRISPR-Cas9 – do inglês *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated Cas9*

crRNA – CRISPR RNAs

CS – Condroitin Sulfato

CTM – Células tronco mesenquimais

DLD – Doenças Lisossômicas de Depósito

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DS – Dermatan Sulfato

GAG – Glicosaminoglicanos

gRNA – RNA guia

HDR – do inglês *homologous directed repair*

HLA – Human leukocyte antigen

HS – Heparan Sulfato

IDUA – alpha-L-iduronidase

*Idua* – alpha-L-iduronidase murina

KS – Keratan Sulfato

M6F – Manose-6-fosfato

M6FR – Receptor de manose-6-fosfato

MPS I – Mucopolissacaridose tipo I

MPS II – Mucopolissacaridose tipo II

MPS III – Mucopolissacaridose tipo III

MPS III – Mucopolissacaridose tipo III

MPS VI – Mucopolissacaridose tipo VI

MPS IX – Mucopolissacaridose tipo IX



mRNA – RNA mensageiro

*NHEJ* – do inglês *non-homologous end joining*

OMIM – do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*

PAM – do inglês *protospacer adjacent motifs*

RNA – Ácido ribonucléico

SCID-X1 – imunodeficiência combinada grave ligada ao X

TALE – do inglês *Transcription activator-like effector*

TALLEN – do inglês *transcription activator-like effector nuclease*

TCTH – Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

tracrRNA – CRISPR RNA transativador

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

UENH – união de extremidades não homólogas

ZFN – do inglês *zinc finger nuclease*

## RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica de depósito (DLD) causada por mutações no gene da alfa-L-iduronidase (IDUA), enzima responsável pela degradação dos glicosaminoglicanos dermatan e heparan sulfato. Os dois tratamentos disponíveis, terapia de reposição enzimática e transplante de células tronco hematopoiéticas, têm limitações importantes. Os sistemas de edição gênica que foram desenvolvidos nos últimos anos parecem ser alternativas promissoras para este tipo de doença. Entre eles, o sistema CRISPR-Cas9 tem se destacado. Descrito como uma forma de sistema imune de bactérias, ele foi adaptado para editar locais precisos do genoma humano e de outros eucariotos. O objetivo geral desta tese foi utilizar o sistema CRISPR-Cas9 para a correção gênica em MPS I. No primeiro trabalho discutimos como a edição gênica pode ser aplicada no tratamento de diferentes DLD. Um dos principais fatores para que a modificação do DNA ocorra de forma eficiente é a entrega intracelular dos vetores em quantidade adequada. Para tanto, no segundo trabalho da tese, descrevemos um protocolo otimizado para transfecção de células tronco mesenquimais (CTM), que são células de difícil transfecção, com Lipofectamina® 3000. Utilizando CTM com poucas passagens, com aproximadamente 70 % de confluência e uma relação lipídeo/DNA de 3 µL/µg, obtivemos até 26 % de células transfectadas. O objetivo do terceiro trabalho da tese foi utilizar o sistema CRISPR-Cas9 para corrigir *in vitro* uma das mutações mais comuns em pacientes com MPS I, responsável pelo fenótipo grave da doença. Fibroblastos humanos homozigotos para p.W402X foram transfectados e analisados por até um mês após o tratamento. A atividade de IDUA nas células transfectadas aumentou significativamente, houve uma diminuição no número e tamanho dos lisossomos, e o sequenciamento de nova geração mostrou que um percentual das células tratadas apresentava a sequência normal do gene da IDUA, confirmando que a mutação patogênica foi corrigida. São apresentados ainda resultados de um trabalho em andamento em que CRISPR-Cas9 e um vetor doador foram utilizados para inserir o cDNA completo da *Idua* em CTM extraídas de camundongos MPS I. Após seleção das células modificadas, a atividade enzimática alta mostrou que a sequência foi corretamente inserida. Os estudos desta tese são uma prova de conceito de que a edição gênica com CRISPR-Cas9 pode ser usada para correção de mutações

responsáveis pela MPS I e abre a possibilidade de uso desta tecnologia como uma nova abordagem terapêutica em doenças de depósito lisossômico.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disease caused by mutations in the alpha-L-iduronidase (IDUA) gene, which encodes the enzyme responsible for degradation of glycosaminoglycans dermatan and heparan sulfate. The two available treatments, enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cells transplantation, have important limitations. The gene editing technologies that have been developed in recent years are promising alternatives for this type of disease. Among them, the CRISPR-Cas9 system has excelled. Described as a form of bacterial immune system, it has been adapted for editing genes in precise points of the human and other eukaryotes genomes. Thus, the overall objective of this thesis was to use the CRISPR-Cas9 system for gene correction in MPS I. In the first study, we discussed how gene editing can be applied to the treatment of different LSD. One of the main factors influencing success of DNA modification is the delivery of vectors in proper amount into the cells. Therefore, in the second work, we described an optimized protocol with Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 for transfection of mesenchymal stem cells (MSC), which are known to be difficult to transfect cells. Using MSC with few passages, approximately 70 % of cell confluency, and a relationship lipid/DNA of 3  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ , we could achieve up to 26 % of transfected cells. The purpose of the third work of this thesis was to use the CRISPR-Cas9 system to correct *in vitro* one of the most common mutations in MPS I patients, responsible for severe MPS I phenotype. Human fibroblasts homozygous for p.W402X were transfected and analyzed for up to a month after treatment. IDUA activity in transfected cells increased significantly, there was a decrease in the number and size of lysosomes, and next generation sequencing showed that a percentage of treated cells presented the normal sequence of IDUA gene, confirming that the pathogenic mutation was corrected. We also report results from a work in progress in which CRISPR-Cas9 and a donor vector were used to insert the complete *Idua* cDNA in MSC extracted from MPS I mice. After selection of modified cells, the high enzyme activity showed that the sequence was properly inserted. The studies in this thesis are a proof of concept that gene editing with CRISPR-Cas9 can be used to correct mutations responsible for MPS I, and opens the possibility of using this technology as a new therapeutic approach in lysosomal storage diseases.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Doenças Lisossômicas de Depósito

Os lisossomos são organelas envoltas por membrana responsáveis pela degradação de diferentes substratos dentro das células eucarióticas. Este processo catabólico é realizado por mais de 60 enzimas solúveis presentes em seu lúmen. Proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e sacarídeos estão entre as macromoléculas celulares que chegam ao lisossomo por meio de endocitose, fagocitose, autofagia ou outras rotas para serem degradadas. Estes substratos sofrem sucessivas hidrólises em ligações específicas por meio da ação gradual de enzimas individuais (Schultz et al., 2011). Se um membro da cascata enzimática estiver deficiente a sequência de degradação é interrompida e o substrato se acumula, resultando em um grupo de situações patológicas, as doenças lisossômicas de depósito (DLD).

As DLD são um grupo que abrange aproximadamente 50 patologias. São erros inatos do metabolismo, de herança monogênica e, com raras exceções, autossômica recessiva. Possuem uma fisiopatologia comum, na qual há deficiência total ou parcial de uma das enzimas específicas envolvidas nas vias de degradação de macromoléculas no lisossomo, ou de proteínas responsáveis pela biogênese e maturação da organela (Giugliani, 2012).

Além das alterações celulares causadas diretamente pelo acúmulo do substrato não degradado, este acúmulo serve como gatilho para uma complexa cascata de eventos, como armazenamento de substratos secundários, perturbações da homeostase do cálcio e do tráfego de lipídeos, entre outros, que contribuem para as manifestações clínicas da doença. Outras manifestações, relacionadas ao papel do lisossomo no tráfego de vesículas, como a apresentação de antígenos e transdução de sinal contribuem para os distúrbios inflamatórios e autoimunes observados nas DLD (Parkinson-Lawrence et al., 2010). Alterações nos mecanismos celulares gerais, como estresse do retículo, estresse oxidativo e bloqueio da autofagia também desempenham um papel na patogênese dessas doenças (Vitner et al., 2010).

Apesar da grande heterogeneidade de sintomas, a maioria destas doenças caracteriza-se por seu curso progressivo. A maior parte dos pacientes é assintomática ao

nascimento e apresenta os primeiros sintomas durante a infância. As DLD apresentam alta morbidade que reduz, às vezes drasticamente, o tempo de vida. A sua frequência varia em diferentes regiões e populações. Apesar de individualmente raras, sua prevalência conjunta estimada varia de 1:4000 a 1:9000 nascidos vivos (Giugliani, 2012). Em adultos as doenças de Gaucher (OMIM #230800), Fabry (OMIM #301500) e Niemann-Pick tipo A (OMIM #257200) são as DLD mais comuns (Wilcox, 2004). Convencionalmente elas são agrupadas pelo tipo de substrato não degradado que se acumula: esfingolipidoses, mucopolissacaridoses, glicoproteínoses e outras.

### ***1.1.1. Mucopolissacaridoses***

As mucopolissacaridoses (MPS) são DLD causadas pela deficiência na atividade de enzimas que degradam glicosaminocanos (GAG, antigamente chamados mucopolissacarídeos), principais componentes da matriz extracelular. Os GAG são cadeias polissacarídicas não ramificadas, compostas por repetições de dissacarídeos ligados a um núcleo proteico formando os proteoglicanos (Esko et al., 2009). Um dos dois açúcares no sacarídeo repetido é um amino açúcar (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) o qual, na maioria das vezes, é sulfatado. O segundo açúcar é normalmente um ácido urônico (glucurônico ou idurônico). Quatro principais grupos de GAG são distinguidos, de acordo com seus açúcares e o número e localização do grupo sulfato: (1) hialuronan, (2) condroitin sulfato e dermatan sulfato, (3) heparan sulfato e (4) queratan sulfato (Kim et al. 2011). Normalmente, no lisossomo, eles sofrem um processo de degradação através de reações sequenciais de hidrólise, formando monossacarídeos e sulfato inorgânico (Hopwood and Morris, 1990).

As moléculas de GAG interagem com uma grande variedade de proteínas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. Além das funções de sustentação, permeabilidade e organização da estrutura da matriz extracelular, os GAG também interferem na estabilidade e atividade de proteínas, e atuam como moléculas sinalizadoras na matriz (Clarke, 2011). Portanto alterações na composição de GAG podem ter consequências diversas em um organismo.

As manifestações clínicas das MPS são heterogêneas e, uma vez que as enzimas lisossômicas são expressas de forma constitutiva, suas deficiências geralmente levam a complicações multissistêmicas. Nas MPS, incluem principalmente rigidez articular, malformações ósseas, retardo de crescimento, alterações pulmonares, oculares,

hepáticas e cardíacas, além de anormalidades neurológicas (Lehman et al., 2011). Para a maioria dos pacientes existe correlação genótipo-fenótipo e os sintomas correspondem à quantidade de enzima produzida em cada caso (Baldo et al., 2014). Já foram descritas 7 formas principais de MPS, que se diferenciam principalmente pela enzima deficiente, e que são classificadas numericamente de MPS I a IX, sendo as MPS V e VIII inexistentes. Com exceção da MPS II, que tem herança ligada ao cromossomo X, todas as outras são herdadas de forma autossômica recessiva (Tabela 1).

**Tabela 1:** Tipos de Mucopolissacaridoses, epônimo, substrato armazenado e enzima deficiente.

Tipo de MPS	Epônimo	GAG acumulado	Enzima deficiente
MPS I	Hurler, Hurler-Scheie Scheie	DS, HS	$\alpha$ -L-iduronidase
MPS II	Hunter	DS, HS	iduronato sulfatase
MPS III	Sanfilippo, tipos A-D	HS	A: heparan-N-sulfatase B: $\alpha$ -N-acetilglicosaminidase C: acetil-CoA: $\alpha$ -glicosaminida-N-acetiltransferase D: N-acetilglicosamina-6-sulfatase
MPS IV	Morquio, tipos A e B	A: KS, CS B: KS	A: N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase B: $\beta$ -galactosidase
MPS VI	Maroteaux-Lamy	DS	arilsulfatase B
MPS VII	Sly	DS, HS, CS	$\beta$ -glucuronidase
MPS IX	Deficiência de hialuronidase	Desconhecido	hialuronidase

DS: Dermatan sulfato; HS: Heparan sulfato; KS: Keratan sulfato; CS: Condroitin sulfato

A triagem inicial de pacientes com suspeita clínica de MPS é feita por detecção da excreção aumentada de GAGs na urina. O diagnóstico definitivo é feito por meio da medida da atividade enzimática em leucócitos, fibroblastos ou plasma dos pacientes após triagem. Ainda, a pesquisa de mutações nos genes envolvidos serve como diagnóstico complementar e para o aconselhamento genético dos familiares (Matte et al., 2003). O diagnóstico ao nascimento só é realizado em casos onde já existe algum

familiar afetado, já que neonatos não possuem sinais clínicos evidentes. Entretanto, em algumas regiões que possuem alta incidência populacional de alguma das MPS, tem-se sugerido a realização de triagem neonatal, já que quanto mais cedo é iniciado o tratamento, quando disponível, maiores serão os seus benefícios (Giugliani, 2012). O diagnóstico neonatal possibilita, em alguns casos, predizer a gravidade da doença do paciente dentro do espectro de características clínicas. Assim, as mutações sem sentido, nas quais há a presença de um códon de terminação prematuro estão relacionadas ao fenótipo grave da doença, enquanto outros tipos de mutações (em sítios de *splice*, de troca de sentido, deleções e inserções) são heterogêneas quanto à correlação com o fenótipo.

#### *1.1.1.1. Mucopolissacaridose tipo I*

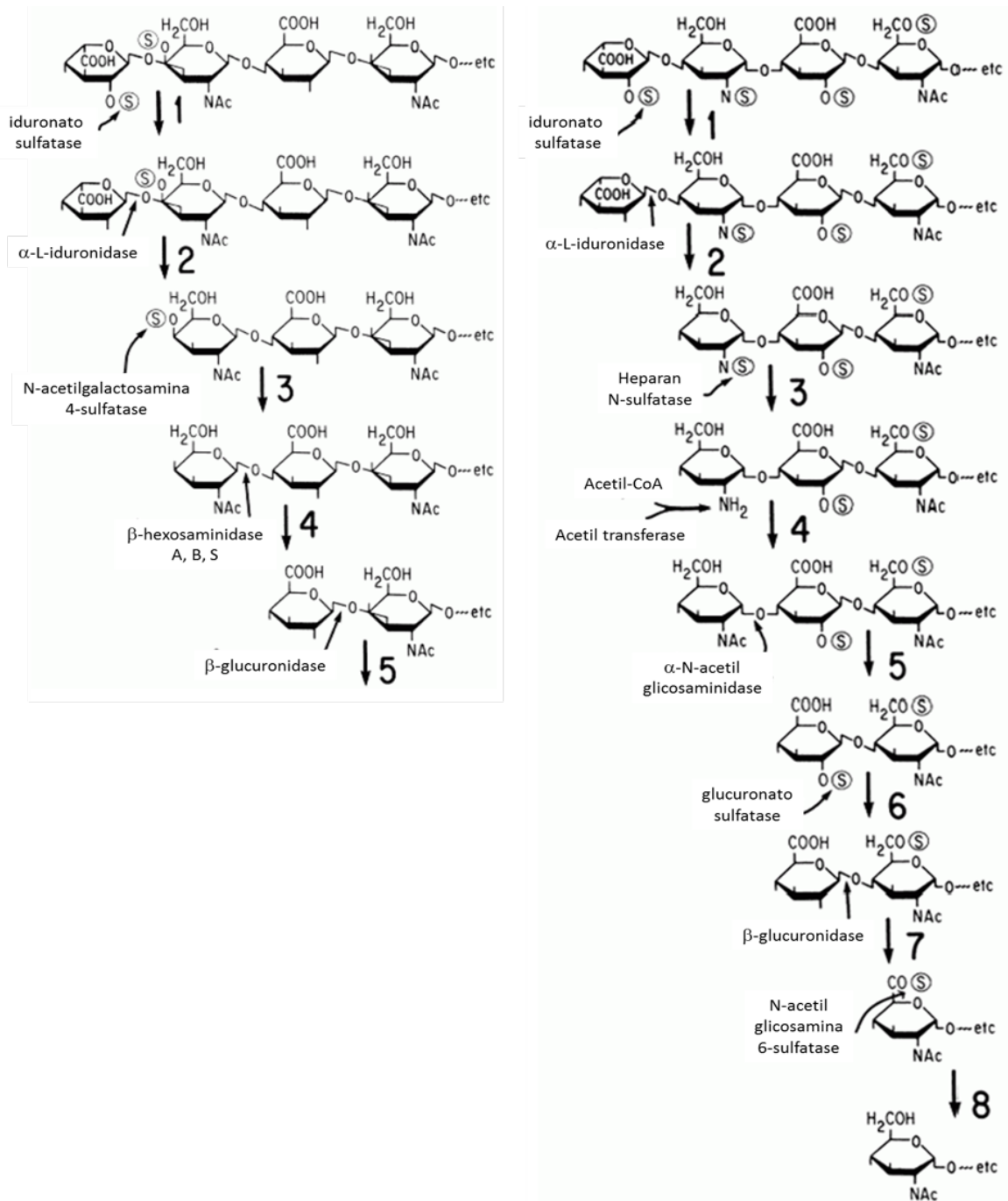
A MPS I é causada por mutações no gene da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), localizado em seres humanos no cromossomo 4 (4p16.3). Em humanos, o gene da IDUA tem tamanho total de 2,1 kb e possui 14 éxons que originam uma proteína de 653 aminoácidos (Scott et al., 1992). A enzima tem um tamanho inicial de 73 kDa e é processada a uma forma madura de 69 kDa. No Brasil, existem duas mutações que são particularmente prevalentes, a W402X e a P533R, que estão presentes em cerca de 70% dos pacientes (Matte et al, 2003).

A deficiência de IDUA leva ao acúmulo de seus substratos catabólicos dermatan sulfato e heparan sulfato (D'Aco et al., 2012) (Figura 1). O heparan sulfato é composto principalmente por ácido glicurônico e glicosaminas, estando presente em proteoglicanos associados à membrana plasmática de diversos tipos celulares, inclusive de neurônios (Schubert, 1989). O dermatan sulfato é composto principalmente por ácido L-idurônico e N-acetilgalactosamina sulfatada e está presente na matriz em tecidos conectivos, como tendões e válvulas cardíacas (Hopwood and Morris, 1990).

A MPS I é uma doença crônica, progressiva, com manifestações clínicas heterogêneas. É historicamente classificada clinicamente em três síndromes, de acordo com a idade de aparecimento dos sintomas, a velocidade de progressão e a presença e grau de comprometimento neurológico (Pastores et al., 2007). Entretanto, as manifestações clínicas se apresentam dentro de um espectro contínuo de variabilidade



fenotípica, e a maioria dos pacientes têm características intermediárias, o que torna difícil a classificação em uma das três divisões (Muñoz-Rojas et al., 2011).



**Figura 1:** Rota de degradação do dermatan sulfato (esquerda) e heparan sulfato (direita). A deficiência da atividade enzimática da enzima alfa-L-iduronidase, segunda enzima na cascata, causa a Mucopolissacaridose tipo I. Adaptado de Neufeld e Muenzer (2001).

Nos pacientes que desenvolvem os sintomas mais graves da MPS I, fenótipo historicamente chamado de síndrome de Hurler (OMIM #607014), as manifestações clínicas sistêmicas aparecem no primeiro ano de vida, e progridem com aparecimento de defeitos cognitivos, doença valvular cardíaca, anormalidades respiratórias e esqueléticas, rigidez nas articulações, hepatoesplenomegalia e opacidade da córnea, o que leva à morte precoce usualmente antes dos 10 anos de vida (Giugliani et al., 2010). Pacientes com a forma mais atenuada da doença, síndrome de Scheie (OMIM#607016), não apresentam manifestações neurológicas. Os sintomas incluem, em intensidade variável, rigidez articular, valvulopatia aórtica, opacidade da córnea e outras complicações, como surdez, hérnia umbilical e inguinal e glaucoma, e aparecem mais tardiamente na infância. Os afetados geralmente sobrevivem até a idade adulta (Tomatsu et al., 2010). A forma intermediária da doença, síndrome de Hurler-Scheie (OMIM #607015), tem pouca ou nenhuma alteração cognitiva, e sobrevivência até a adolescência ou início da fase adulta, sendo as complicações cardíacas e a obstrução das vias aéreas superiores as principais causas de morte (Neufeld e Muenzer, 2001).

A incidência mundial estimada da MPS I é de 1 caso para cada 100.000 nascidos vivos. Aproximadamente 50 a 80% dos pacientes têm a forma mais grave da doença (Muenzer et al., 2009). Entretanto, esta estimativa pode não estar totalmente correta, já que os casos mais graves são mais facilmente diagnosticados do que os casos atenuados. O diagnóstico inicial da MPS I é baseado no reconhecimento dos sintomas clínicos e em testes bioquímicos para detecção de GAGs na urina e em ensaios enzimáticos. Estes são realizados em fibroblastos cultivados, plasma ou leucócitos e utilizam substratos fluorescentes específicos para IDUA. A deficiência na atividade da enzima e a excreção aumentada de GAGs urinários estão presentes em todos os pacientes.

Antes do desenvolvimento de terapias específicas para a doença, o tratamento da MPS I era paliativo e baseado em sintomas. Atualmente existem duas opções de tratamento, o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e a terapia de reposição enzimática (TRE), porém nenhuma é totalmente eficaz e curativa. Ambos se baseiam no fato de que a enzima IDUA é modificada com resíduos de manose-6-fosfato (M6P), podendo ser captada por receptores específicos para enzimas lisossômicas, os receptores de manose-6-fosfato (M6PR) das células adjacentes (Tomanin et al., 2012).

O transplante de células tronco hematopoiéticas foi primeiramente utilizado em pacientes com síndrome de Hurler em 1981 (Hobbs et al., 1981), e desde então mais de 500 pacientes já foram tratados com esta técnica. No TCTH, são transplantadas células

tronco da medula óssea ou do cordão umbilical de doadores saudáveis. A IDUA produzida por estas células é liberada no plasma do paciente e pode ser internalizada pelas células que não a produzem através dos M6PR. Quando bem sucedido, o TCTH pode prolongar a vida do paciente, preservar a neurocognição e melhorar as alterações somáticas. Um ano após o transplante, em muitos casos, é possível observar redução da hepatoesplenomegalia, das características fenotípicas faciais, da rigidez articular, da apneia do sono e melhora dos problemas cardíacos e da audição (Martins et al., 2009). Entretanto, devido aos riscos associados a este procedimento, entre eles a possibilidade de desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro, ele só é recomendado para pacientes com a forma grave da MPS I e que tenham menos de dois anos de idade, o que ressalta a importância do diagnóstico precoce. Outras limitações do tratamento são a dificuldade de encontrar doadores HLA compatíveis e a falta de efeito sobre as deformidades ósseas e neurológicas já existentes (Giugliani et al., 2010).

A terapia de reposição enzimática consiste na administração da enzima deficiente por meio de repetidas injeções intravenosas. Em 1990 os pacientes com doença de Gaucher foram os primeiros beneficiados por este tratamento, que hoje também está disponível para doença de Fabry, doença de Pompe, MPS I, II, IV e VI. A TRE também se baseia na internalização da IDUA por meio da ligação desta aos M6PR presentes nas células do paciente. A enzima comercial utilizada para o tratamento de MPS I, laronidase (IDUA humana recombinante, Aldurazyme®, BioMarin/Genzyme, EUA), foi aprovada em 2003 para o tratamento das manifestações não neurológicas da doença. É a primeira opção de tratamento para pacientes com síndromes de Hurler-Scheie e Scheie, e também é utilizada em pacientes Hurler que não são candidatos a TCTH (Dickson et al., 2011). A laronidase deve ser administrada por via intravenosa semanalmente ou a cada duas semanas durante toda a vida do paciente. Entre os benefícios observados nas pessoas tratadas com TRE estão a melhora na mobilidade das articulações, na capacidade de caminhar, nas funções respiratória e cardíaca, redução do volume do fígado e do baço e redução da excreção de GAG urinários (Valayannopoulos and Wijburg, 2011). Apesar de ser a opção terapêutica disponível mais segura, a TRE ainda tem limitações importantes. Entre elas estão as reações adversas apresentadas por alguns pacientes (cefaleia, dor abdominal, dispneia, calafrios, artralgia, hipertensão/hipotensão, reações de hipersensibilidade e exantema), e o alto custo para o sistema público de saúde (Souza et al., 2008). Entretanto o principal fator limitante da TRE é a incapacidade da enzima administrada passar a barreira hematoencefálica e

assim atingir o sistema nervoso central e atenuar os sintomas neurológicos da doença (Giugliani et al., 2010).

Como tanto o TCTH quanto a TRE têm limitações importantes e falham em corrigir alguns dos sintomas mais importantes observados em pacientes com MPS I, novas alternativas terapêuticas são necessárias e estão sendo investigadas. Essas alternativas incluem a TRE intratecal (Dickson et al., 2015; Munoz-Rojas et al., 2008; Vera et al., 2013), tradução alternativa (Keeling and Bedwell, 2002), terapia de redução do substrato (Kingma et al., 2014; Moskot et al., 2016), administração de chaperonas farmacológicas (Maegawa et al., 2007; Okumiya et al., 2007) e as diversas formas de terapia gênica (Di Natale et al., 2002; Fraga et al., 2015a; Lagranha et al., 2013; Tomanin et al., 2012; Visigalli et al., 2010).

## 1.2. Terapia gênica

A terapia gênica é definida como a modificação genética de células com a intenção de alterar a expressão de algum gene para prevenir, impedir ou reverter um processo patológico (Kay, 2011). Embora utilizada para o tratamento de diversas doenças, inclusive de causas multifatoriais, as DLD são candidatas ideais à terapia gênica, já que são monogênicas e não são reguladas por mecanismos complexos. Além disso, a correção de um número relativamente baixo de células geralmente é suficiente, já que as células não corrigidas podem internalizar a enzima secretada pelas corrigidas, e assim reverter o seu fenótipo (Baldo et al., 2014).

Existem duas principais formas de terapia gênica. Na transferência gênica *in vivo*, os vetores contendo o material genético de interesse são inseridos diretamente no paciente. Já na terapia gênica *ex vivo*, células são extraídas, modificadas geneticamente em laboratório e então introduzidas no paciente. A escolha entre os métodos *in vivo* ou *ex vivo* depende das características da doença a ser tratada, do tipo de estudo, do vetor utilizado e da segurança do procedimento. Para a MPS I existem protocolos pré-clínicos que usam a abordagem *in vivo* (Metcalf et al., 2010), bem como *ex vivo* (Visigalli et al., 2010).

Os principais tipos celulares utilizados para a terapia gênica *ex vivo* são células tronco, que têm capacidade de se expandir e se diferenciar em outros tipos celulares, sendo assim fontes de produção constante da proteína de interesse. As células tronco

mesenquimais (CTM) têm capacidade de se diferenciar em muitos dos tipos de células que são afetadas na MPS, e células corrigidas podem ser utilizadas para substituir estas populações. Jackson e colaboradores (2015) modificaram CTM derivadas da medula óssea e da polpa dentária para superexpressar as enzimas deficientes em MPS I, II, IIIA, IVA, VI e VII e relataram que as células modificadas continuaram mantendo sua capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica *in vitro*. Baxter e colaboradores (2002) também fizeram estudos *in vitro* e demonstraram que CTM superexpressando IDUA eram capazes de liberar a enzima e corrigir CTM não modificadas de pacientes com MPS I. Em um outro trabalho, foram injetadas CTM expressando IDUA no cérebro de camundongos MPS I e elas foram eficientes em reduzir a neurodegeneração normalmente observada nestes animais (da Silva et al., 2012).

Um dos principais desafios da utilização da terapia gênica é a entrega do material genético para o interior da célula. Para isso são utilizadas moléculas carreadoras chamadas vetores. Existem diversos tipos de vetores utilizados com este fim, que são divididos em dois grandes grupos: virais e não virais.

Para o uso de vetores virais em terapia gênica algumas modificações na estrutura dos vírus são feitas para torná-los mais seguros. Os genes que controlam sua replicação são retirados e o gene terapêutico é adicionado. Os quatro tipos de vetores virais mais comuns utilizados para terapia gênica *in vivo* ou *ex vivo* são adenovírus, vírus adenoassociados, lentivírus e retrovírus.

Os adenovírus são vetores formados por DNA fita dupla e podem transferir até 37 kb de informação genética. Seu genoma não se integra no genoma da célula hospedeira e têm alta imunogenicidade, portanto são vetores cuja expressão é reduzida a alguns dias ou semanas após o tratamento. Por isso são bastante utilizados para tratamento de tumores e não são bons candidatos para o tratamento de MPS I.

Lentivírus e retrovírus são vírus envelopados, formados por RNA de fita simples. Ambos têm capacidade de integrar seu genoma ao da célula hospedeira. Essa característica pode ser considerada uma vantagem, já que permite expressão estável e permanente, mesmo após a divisão celular. Entretanto, também pode representar um problema, já que podem promover mutagênese insercional e ativar oncogenes, conforme já foi relatado em pacientes com imunodeficiência severa combinada (Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

Os vetores virais que apresentam mais vantagens em relação aos outros são os adenoassociados. São vírus pequenos, formados por DNA fita simples, não patogênicos, e que normalmente não se integram no genoma da célula hospedeira, mas por formar concatâmeros no núcleo, têm expressão a longo termo sustentada. Sua principal desvantagem é o limite de tamanho do gene terapêutico a ser inserido, que é de aproximadamente 4,5 kb por partícula viral (Templeton and Perlman, 2008). Uma característica exclusiva desse tipo de vetor é a habilidade de alguns deles para passar a barreira hematoencefálica e chegar até o sistema nervoso central, o que os torna vetores ideais para o tratamento de DLD neuropáticas (Foust et al., 2009).

Vários protocolos de terapia gênica utilizados para o tratamento de MPS utilizam vetores adenoassociados, lentivírus ou retrovírus (Fu et al., 2016; Hinderer et al., 2016). Entretanto, devido principalmente aos problemas de segurança relacionados aos vetores virais, técnicas utilizando vetores não virais têm sido desenvolvidas.

Os vetores não virais têm como principal vantagem em relação aos vetores virais a sua segurança, já que são menos patogênicos e geralmente não se integram no DNA genômico, excluindo o risco de mutagênese insercional. Também costumam ter menor custo e maior facilidade de produção e manipulação (Fraga et al., 2015a). Entre os mais utilizados estão os lipossomas e as nanoemulsões lipídicas.

Os vetores baseados em lipídeos formam complexos com o DNA por meio de interações eletrostáticas entre os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos e a superfície dos lipídeos catiônicos, formando complexos multilamelares em que os ácidos nucleicos carregados negativamente permanecem presos à bicamada lipídica, favorecendo assim a passagem através das membranas celulares (Matte et al., 2011a). Nosso grupo demonstrou tanto *in vitro*, em fibroblastos de pacientes, quanto *in vivo*, em camundongos MPS I, a eficiência de transfecção, medida por atividade enzimática da IDUA, de emulsões catiônicas como vetores carreadores de um plasmídeo contendo o gene da IDUA (Fraga et al., 2015a, 2015b).

Os transposons também são vetores bastante utilizados para transferência gênica. Eles se integram no genoma promovendo assim expressão gênica estável e a longo termo. Aronovich e colaboradores (2009) utilizaram transposons como vetores para terapia gênica em camundongos MPS I, e observou um aumento de até 100 vezes na atividade enzimática de IDUA de alguns animais quando comparados a camundongos normais. Entretanto, em animais que não recebiam imunossupressão, a atividade voltava ao nível basal em até 4 semanas e foram observados infiltrados inflamatórios. Em

camundongos imunodeficientes, a atividade enzimática no plasma se manteve por até 18 semanas e foi detectada em todos os tecidos analisados.

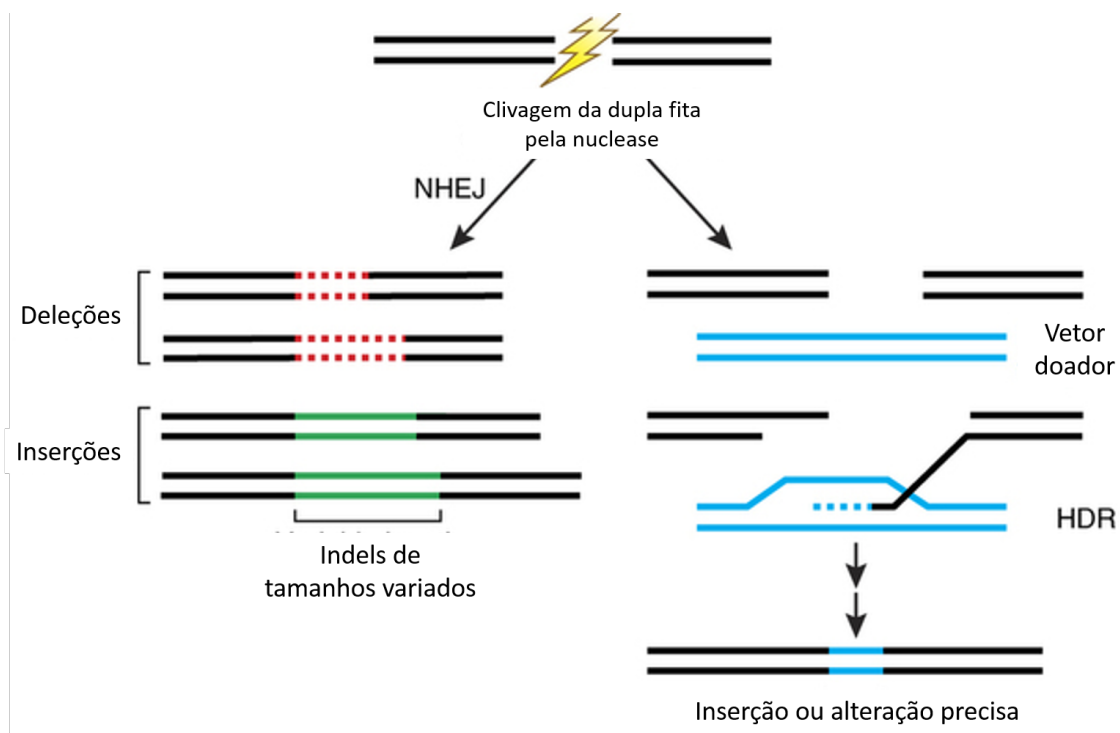
A microencapsulação celular é outra forma de terapia gênica não viral. Nela, células modificadas geneticamente são isoladas em uma membrana semipermeável, que permite a troca de metabólitos e nutrientes entre as células e o ambiente externo, ao mesmo tempo em que protege o material encapsulado da ação do sistema imune (Matte et al., 2011b). Baldo e colaboradores (2012a) mostraram aumento da atividade de IDUA e redução de GAG em fibroblastos de pacientes com MPS I após 15, 30 e 45 dias de cocultivo com células encapsuladas superexpressando a enzima. As células encapsuladas também foram implantadas no peritônio de camundongos MPS I e após 4 meses análises histológicas mostraram redução de acúmulo de GAG e nos tecidos analisados. Entretanto, a atividade de IDUA não foi diferente dos animais não tratados (Baldo et al., 2012b).

Embora mais seguros, os vetores não virais possuem limitações importantes para o uso em terapia gênica. As principais estão relacionadas a sua baixa eficiência de transfecção e ao silenciamento do transgene. Diversos estudos têm sido realizados visando a melhora na segurança e eficiência dos protocolos tradicionais de terapia gênica. Entretanto, uma nova abordagem baseada na edição direcionada do DNA genômico tem ganhado cada vez mais espaço nos últimos anos.

### ***1.2.3. Edição gênica***

A introdução de alterações específicas em sequências do genoma de células tem gerado cada vez mais expectativas como o tratamento ideal para doenças genéticas. Durante muito tempo, estratégias utilizadas para induzir alterações precisas e específicas no DNA eram restritas a poucos organismos (por exemplo, recombinação homóloga em leveduras), principalmente pela baixíssima eficiência das técnicas utilizadas. Na década passada começou a ser utilizada uma nova abordagem que permite manipular virtualmente qualquer gene de uma variada gama de tipos de células e organismos. Esta tecnologia, nomeada edição gênica, baseia-se no reconhecimento de sequências e na utilização de nucleases manipuladas em laboratório. Para isso, são utilizados sistemas compostos por um domínio de ligação a sequências específicas de DNA unido a um módulo de clivagem de ácidos nucleicos (Cox et al., 2015).

Um primeiro passo crucial para a realização de edição gênica é a criação de uma quebra na fita dupla de DNA no locus genômico a ser modificado. A quebra induzida pela nuclease será reparada por pelo menos um dos dois mecanismos de reparo diferentes que acontecem em quase todos os tipos de células e organismos: união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) e recombinação homóloga direcionada (HDR, do inglês *homologous directed repair*) (Figura 2) (Cox et al., 2015).



**Figura 2.** Edição gênica induzida por nuclease. A clivagem da fita dupla de DNA provocada pela nuclease está sujeita a duas formas de mecanismos de reparo: NHEJ ou HDR. O reparo mediado por NHEJ pode resultar em inserções ou deleções de tamanhos variados no local da quebra do DNA. O reparo mediado por HDR necessita a presença de uma sequência doadora, que pode ser fita simples ou dupla, que servirá como molde e assim podem ser introduzidas mutações de ponto ou podem ser inseridas novas sequências. Adaptado de Sander and Joung (2014a).

A NHEJ é feita por enzimas que promovem a religação das fitas sem um molde. É, portanto, um mecanismo sujeito a erros, já que normalmente alguns nucleotídeos são



retirados ou adicionados à fita de DNA, causando mutações de inserção/deleção (indels) de vários tamanhos, o que pode alterar a fase de leitura da sequência codificadora ou sequências de regulação da transcrição, alterando ou inativando a expressão correta do gene (Sander and Joung, 2014a). A edição gênica seguida por NHEJ tem sido muito utilizada para a criação de modelos celulares e animais nocaute para diversos genes (Lin and Musunuru, 2016; Parant and Yeh, 2016; Tschaharganeh et al., 2016).

O mecanismo de HDR acontece quando um DNA exógeno complementar à sequência onde houve a quebra da fita dupla (doador) serve como molde para a reconstrução das fitas. Assim é possível construir sequências doadoras com alterações de nucleotídeos, que serão então incorporados ao DNA genômico. Portanto, esse mecanismo pode ser utilizado para introduzir ou corrigir mutações pontuais específicas ou para inserir sequências desejadas, desde que elas estejam flanqueadas por regiões homólogas ao locus que se deseja alterar. Com a quebra da fita dupla de DNA induzida por nucleases, as frequências destas alterações são normalmente maiores do que 1% e, em alguns casos, chegam a mais de 50% (Sander and Joung, 2014a).

Os primeiros sistemas utilizados para edição gênica foram enzimas quiméricas. As mais importantes são as nucleases dedo de zinco (ZFN, do inglês *zinc finger nuclease*) e as nucleases efetoras tipo ativadoras de transcrição (TALEN, do inglês *transcription activator-like effector nuclease*). Ambas têm um domínio proteico que se liga a sequências específicas de DNA fusionado à nucleasse FokI, que cliva o DNA. Mais recentemente começou a ser utilizada uma plataforma que é baseada em RNA, o sistema CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated Cas9*) (Cox et al., 2015).

#### *1.2.3.1. Zinc Finger Nucleases*

Os dedos de zinco são domínios proteicos que se ligam ao DNA. São compostos por aproximadamente 30 aminoácidos em uma configuração conservada de duas folhas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice. Em cada dedo de zinco, os aminoácidos da superfície da alfa-hélice interagem com sequências específicas de 3 nucleotídeos da fita de DNA. Diferentes dedos de zinco se organizam em módulos e se ligam a sequências de DNA diferentes. O desenvolvimento de arranjos que não se formam naturalmente contendo mais de três domínios permitiu que estas proteínas fossem utilizadas para

reconhecimento de sequências genômicas específicas. Assim, foi desenvolvido pela primeira vez, um sistema que conseguia reconhecer e se ligar a sequências específicas no genoma de até 18 bases (Carroll, 2011). A construção destes módulos envolve o uso de bibliotecas de domínios dedo de zinco, que reconhecem quase todos os 64 possíveis trios de nucleotídeos. Portanto, é possível construir combinações de domínios em módulos para reconhecimento de sequências específicas em virtualmente todas as regiões do genoma (Cox et al., 2015).

O domínio de clivagem de DNA presente nas ZFN é a enzima de restrição *FokI*, que é ligada à extremidade C-terminal do domínio de ligação ao DNA. Para que ocorra a clivagem da dupla fita, a *FokI* deve formar um dímero. Portanto, para cada quebra que se deseja fazer na dupla fita de DNA, devem ser utilizadas duas ZFN que se ligam nas fitas opostas de DNA com cinco a sete pares de base de distância entre suas extremidades C-terminal. Dessa forma, se as duas ZFN se ligarem às suas sequências específicas, a *FokI* dimeriza e cliva a dupla fita de DNA (Figura 3A) (Lin and Musunuru, 2016).

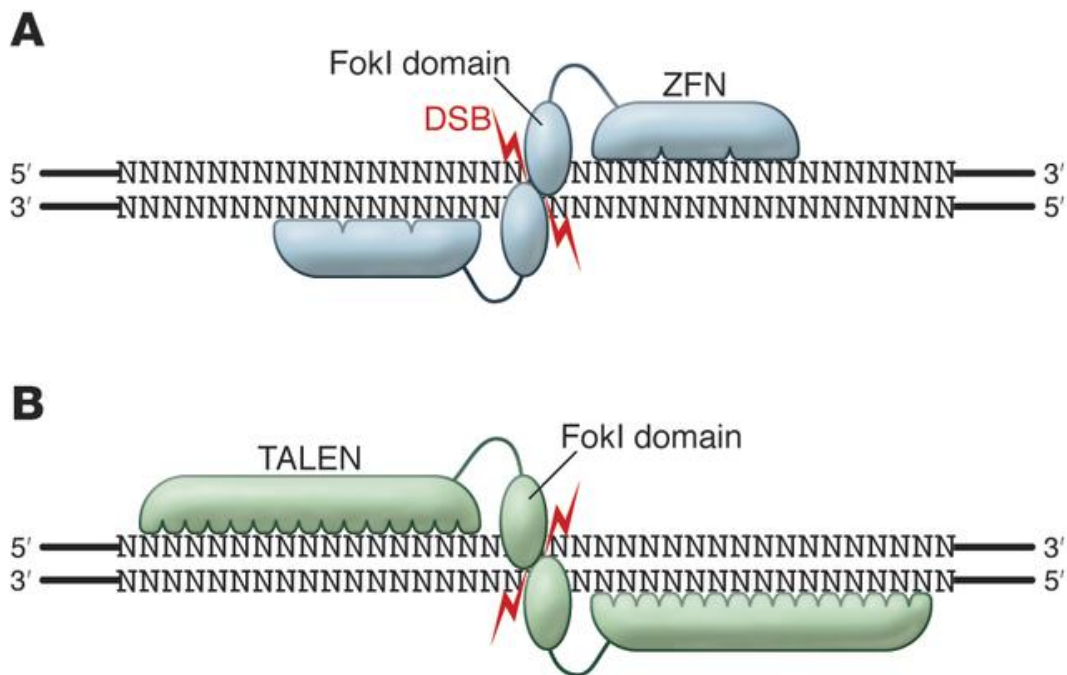
Genovese e colaboradores (2014) utilizaram ZFN em um modelo de imunodeficiência combinada grave ligada ao X (SCID-X1). Eles corrigiram células tronco hematopoiéticas humanas e as transplantaram em camundongos modelo da doença. As células editadas sustentaram a hematopoiese e deram origem a células linfoides funcionais que possuíam vantagem de crescimento em relação às células mutadas.

#### 1.2.3.2. *Transcription activator-like effector nuclease*

*Transcription activator-like effector* (TALE) são proteínas que ocorrem naturalmente em bactérias *Xanthomonas*, patógenos de plantas. Elas contêm domínios de ligação ao DNA composto por séries 33 a 35 aminoácidos, e cada um reconhece um nucleotídeo. Os domínios diferem um do outro apenas por dois aminoácidos nas posições 12º e 13º, que determinam qual nucleotídeo será reconhecido. Assim como nas ZFN, eles são combinados em módulos por meio de clonagens moleculares para reconhecer sequências específicas de DNA (Guilinger et al., 2014). A única limitação no reconhecimento de sequências por TALE é que ela deve começar com uma timina (Grau et al., 2013).

A nucleasse de restrição utilizada na construção das TALEN é a *FokI*, a mesma encontrada nas ZFN. Portanto, também devem ser construídas duas TALEN para cada sequência que se deseja clivar, para que a enzima possa formar um dímero e clivar a dupla fita de DNA (Figura 3B).

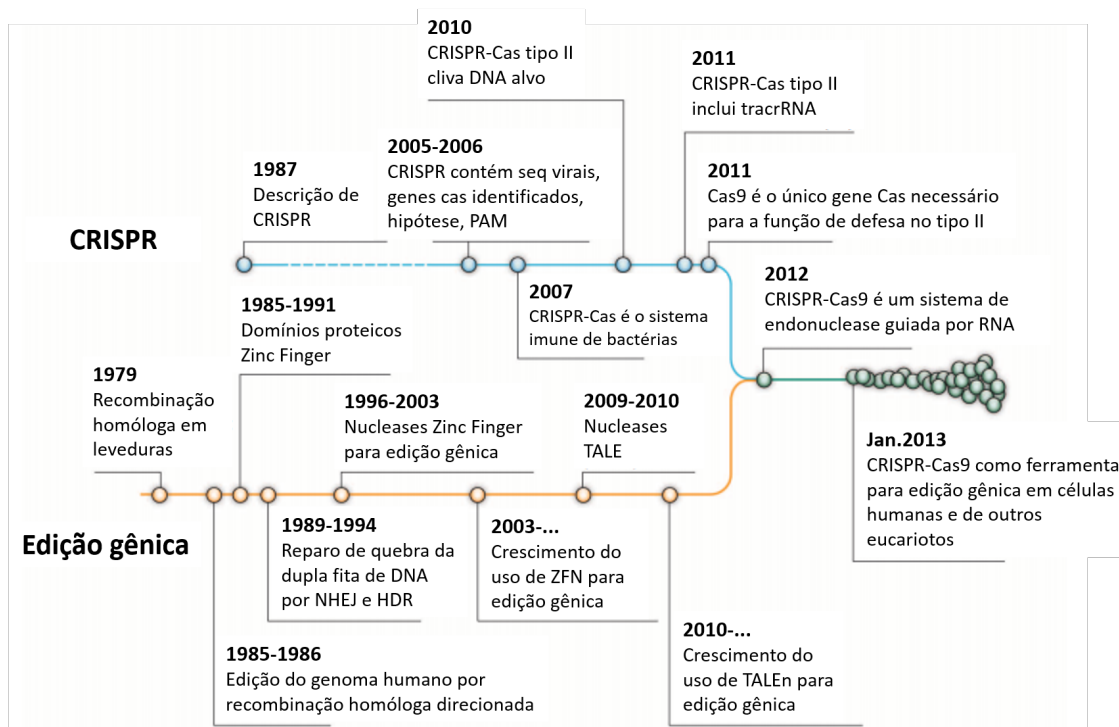
Voit e colaboradores (2013) utilizaram o sistema TALEN para edição gênica no gene da beta-globina, que quando mutado, causa anemia falciforme. A dupla fita de DNA de uma linhagem celular foi clivada na região da mutação responsável pela doença e um vetor contendo o cDNA correto da beta-globina foi utilizado como doador para induzir RH. Os resultados mostraram que aproximadamente 19% das células foram corretamente modificadas.



**Figura 3.** Especificidade da ligação ao DNA de ZFN e TALEN. A) As ZFN se ligam a regiões de tamanho variado do DNA e a nuclease *FokI* dimeriza para gerar uma quebra na dupla fita de DNA entre os dois sítios de ligação. B) Ligação heterodimérica de TALEN, que assim com as ZFN, se liga a regiões de tamanhos variados para gerar a clivagem da dupla fita de DNA entre os sítios de ligação. Adaptado de Gupta and Musunuru (2014).

### 1.2.3.3. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

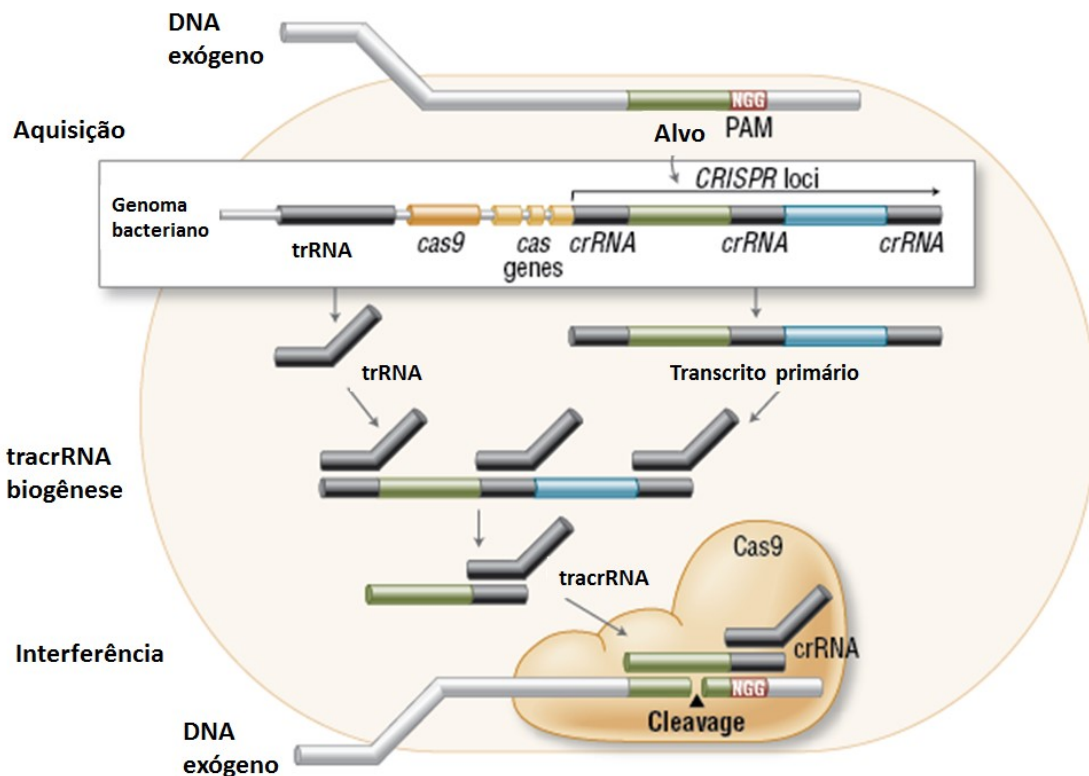
Em paralelo ao desenvolvimento das pesquisas sobre edição gênica, alguns microbiologistas e bioinformatas começaram a investigar um sistema presente em bactérias chamado CRISPR (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*) (Figura 4). Este sistema foi descrito em 1987 como uma série de repetições curtas intercaladas por sequências também curtas no genoma de *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). Após sua descrição, ele passou a ser detectado em diversas bactérias e arqueas (Jansen et al., 2002), e pesquisas com o objetivo de desvendar sua função passaram a ser realizadas. Em 2005 foram publicados trabalhos relatando que várias das sequências que intercalam as repetições têm origem viral ou de plasmídeos. Estas informações, aliadas ao fato de que o locus é transcrito e à observação de que os genes Cas (CRISPR-associated) presentes no locus codificam proteínas com domínios de helicases e nucleases, foi proposto que o sistema CRISPR-Cas poderia funcionar como um sistema de defesa adaptativo que utiliza RNA antisense como memória de invasores passados (Barrangou et al., 2007).



**Figura 4:** Linha do tempo da evolução das pesquisas em edição gênica e CRISPR. Adaptado de Doudna and Charpentier (2014).

O locus genômico CRISPR-Cas em bactérias é formado por um conjunto de genes que codificam as proteínas Cas, seguido por sequências repetidas que separam sequências variáveis não-codificantes inseridas no DNA bacteriano após o contato com genomas invasores. Enquanto os genes Cas são traduzidos em proteínas, o arranjo com as sequências variáveis separadas pelas sequências repetidas são transcritas em um único RNA antes de serem processados em fragmentos curtos de CRISPR RNAs (crRNA), cada um contendo uma sequência de DNA exógeno (chamado de protoespaçador) e parte da sequência repetida. Cada crRNA hibridiza com um segundo RNA, chamado CRISPR RNA transativador (tracrRNA). Os dois RNAs se ligam à uma das proteínas Cas, a nuclease Cas9, e a direcionam para clivar a dupla fita de DNA da sequência alvo, complementar ao protoespaçador. Entretanto, para que o protoespaçador consiga se ligar à sua sequência complementar, ela deve estar adjacente a uma sequência curta de 3 nucleotídeos formados por 5'NGG, chamado motivo adjacente ao protoespaçador (PAM, do inglês *protospacer adjacent motifs*) (Figura 5). Os protoespaçadores que estão incorporados ao genoma bacteriano não são clivados provavelmente porque não estão adjacentes a uma sequência PAM (Sander and Joung, 2014a).

Existem três tipos de sistemas CRISPR-Cas (I, II e III) que utilizam mecanismos moleculares distintos para reconhecer e clivar ácidos nucleicos. O PAM desempenha um papel essencial nos estágios de reconhecimento e interferência nos sistemas tipo I e II. Os sistemas tipo I e III usam um grande complexo de proteínas Cas para o reconhecimento guiado pelo crRNA (Mohanraju et al., 2016). Somente o sistema do tipo II requer apenas uma única proteína ligada ao RNA para o reconhecimento e clivagem da sequência alvo, uma característica que provou ser extremamente útil para aplicações em engenharia genômica (Savitskaya et al., 2016).



**Figura 5.** Sistema CRISPR-Cas9 em bactérias. Quando um DNA invasor entra na célula bacteriana, ele é incorporado ao genoma no locus CRISPR, que é então transcrito em um único RNA. Este é clivado e processado em crRNA, que hibridiza com tracrRNA para formar tracrRNA e se ligar à Cas9. O sistema então reconhece a sequência invasora, caso ela esteja adjacente a um PAM, por complementariedade com o crRNA, e a Cas cliva o DNA invasor, inativando-o. Adaptado de <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>

Para ser utilizado em edições gênicas, o sistema foi adaptado de forma que devem ser introduzidos nas células dois componentes: a nuclease Cas9 e um RNA guia (gRNA), que é correspondente ao crRNA e ao tracrRNA fusionados. Eles podem ser introduzidos nas células na forma de DNA para posteriormente transcritos ou já na forma de RNA (Tschaharganeh et al., 2016). Vinte nucleotídeos na extremidade 5' do gRNA (correspondente ao protoespaçador, a sequência alvo) direcionam a Cas9 ao alvo por meio de pareamento de bases complementares. A única exigência para a escolha da sequência alvo é que ela esteja adjacente a um PAM. Assim, a atividade da Cas9 pode ser direcionada para qualquer sequência de DNA na forma N20-NGG somente

alterando os primeiros 20 nucleotídeos do gRNA para serem complementares à sequência alvo (Lin and Musunuru, 2016).

No ano de 2012 foram feitas as primeiras demonstrações de que a Cas9 poderia ser programada para clivar várias sequências de DNA *in vitro* (Jinek et al., 2012). Já em 2013 foram publicados os primeiros artigos mostrando que o sistema funciona de forma eficiente em diversas células e organismos (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). Ainda são poucos os trabalhos publicados que utilizam CRISPR-Cas9 para tratar doenças genéticas. Paquet e colaboradores (2016) descreveram um método baseado em CRISPR-Cas9 para induzir mutações pontuais específicas em homo e heterozigose por meio de HDR com alta eficiência. Em outro trabalho, camundongos com uma mutação no fator IX de coagulação, causadora de hemofilia B, foram criados utilizando-se o sistema CRISPR-Cas9. Em animais adultos, vetores com componentes do sistema para clivagem e um vetor doador com a sequência correta foram injetados *in situ* nos animais. A análise do fígado dos camundongos revelou que aproximadamente 0,56% dos alelos foram corrigidos, o que foi suficiente para restaurar a homeostase dos animais (Guan et al., 2016). O sistema também foi utilizado para corrigir uma mutação que provoca fibrose cística em células intestinais derivadas de pacientes. Os parâmetros associados à doença foram resgatados nas células corrigidas (Schwank et al., 2013).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Apesar do vasto número de trabalhos e aplicações descritas para as tecnologias de edição gênica para adição ou correção de genes em linhagens celulares ou em modelo animal, ainda são escassos os relatos do uso do sistema CRISPR/Cas9 ou mesmo ZFN e TALEN para corrigir genótipos causadores de DLD, menos ainda em mucopolissacaridoses. A possibilidade de correção de mutações causadoras da doença em células de pacientes com esta tecnologia abre alternativas de formas de tratamento efetivas a longo prazo, seguras e com grandes vantagens em relação aos tratamentos disponíveis atualmente.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar o sistema de edição gênica CRISPR-Cas9 para a correção gênica em um modelo de doença genética monogênica, a Mucopolissacaridose tipo I.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre as melhores estratégias para o uso de edição gênica para o tratamento de doenças lisossômicas de depósito.

- Estabelecer um protocolo simples e eficiente para transfecção de células tronco mesenquimais humanas.

- Transfectar fibroblastos de pacientes com MPS I homozigotos para p.W402X utilizando o sistema CRISPR-Cas9 e um vetor doador com a sequência correta.

- Avaliar a correção das células transfectadas por meio do aumento da atividade de IDUA, da recuperação do tamanho e número de lisossomos, e da modificação da sequência gênica.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Artículo I: Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases**

Current Stem Cell Reports. March 2015, Volume 1, Issue 1, pp 9-15

# Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases

Talita Giacomet de Carvalho & Ursula da Silveira Matte & Roberto Giugliani & Guilherme Baldo

Published online: 22 January 2015  
# Springer International Publishing AG 2015

**Abstract** The recent progress in genome editing technology using the engineered zinc finger nucleases (ZFN), transcriptional activator-like effector nucleases (TALEN), and more recently, clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR-associated protein 9 (CRISPR-Cas9) system have enabled the possibility of precisely modifying target sites in the genome. This technology brings hope of a cure for many genetic diseases. With this review, our goal is to discuss how targeted genome editing can be combined with hematopoietic stem cell transplantation and other approaches to be used for the treatment of a particular group of genetic diseases, the lysosomal storage disorders. We also highlight which diseases within this group would potentially benefit from this treatment and what are the main problems to be addressed to transform this promising technology into reality.

**Keywords** Zinc finger nucleases · TAL effector nucleases · CRISPR-Cas9 · Lysosomal storage disorders

## Introduction

Human genetic diseases arise from mutations in genomic DNA that abrogate normal function of genes. The emergence

of recombinant DNA technology, which could enable the delivery of a “new gene” into the cells of patients, has brought hope of a cure for these diseases, and represents the prototype of gene therapy. Different biological strategies for genome engineering have appeared, but most of them have shown limitations related to low efficiency in gene delivery or in maintaining its expression or present significant risks related to the random insertion of the therapeutic gene into the genome [ 1, 2]. Recently developed protocols for genomic editing through the use of nucleases have provided a much simpler and safer way for targeted gene modification. The engineered proteins zinc finger nucleases (ZFNs) and transcriptional activator-like effector nucleases (TALENs) are based on DNA-binding proteins, whereas the clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR associated protein 9 (CRISPR-Cas9) system is based on RNA-guided DNA recognition [ 3]. They can all be programmed to generate targeted double-strand breaks in genomic DNA. The break activates repair through error-prone non-homologous end joining or homology-directed repair. If non-homologous end joining is activated, the result is insertions and/or deletions (indels) that disrupt the target locus. In the presence of a donor template with homology to the targeted locus, the homology-directed repair pathway operates allowing for precise mutations to be made or corrected, or for DNA sequences to be inserted at much higher frequencies than conventional gene targeting. Double-strand break generation can increase rates of homologous recombination of ssDNA and dsDNA donors by 5-fold and 130-fold, respectively [ 4]. Several studies in cells and animal models using this technology as a form of gene therapy have been published, demonstrating its advantages over conventional gene therapy protocols (Table 1). With this review, our goal is to discuss how targeted genomic editing can be used for the treatment of a particular group of genetic diseases, the lysosomal storage disorders (LSD), which

---

This article is part of the Topical Collection on Genome Editing

T. G. de Carvalho · U. da Silveira Matte · R. Giugliani · G. Baldo (\*)  
Centro de Terapia Genica-Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS 2350, Brazil  
e-mail: gbaldo@hcpa.ufrgs.br

T. G. de Carvalho  
e-mail: talitagiacommet@gmail.com

U. da Silveira Matte  
e-mail: umatte@hcpa.ufrgs.br

R. Giugliani  
e-mail: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

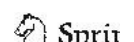


Table 1 List of main pre-clinical studies using nuclease-mediated genome editing to correct mutations in genetic diseases

Genetic disease	Gene	Model organism	Strategy	Reference
X-linked severe combined immunodeficiency	IL2RG	Human hematopoietic stem cells	ZFN	[ 5•]
$\alpha$ -1-antitrypsin deficiency	A1AT	iPSCs derived from patient	ZFN	[ 6]
Parkinson's disease	LRRK2	iPSCs derived from patient	ZFN	[ 7]
Sickle cell disease	HBB	iPSCs derived from patient	TALEN	[ 8]
X-linked severe combined immunodeficiency	IL2RG	Jurkat cells	TALEN	[ 9]
Retinal disease	CRB1	Fertilized oocytes from a mouse model	TALEN	[ 10]
$\beta$ -thalassemia	HBB	iPSCs derived from patient	CRISPR-Cas9	[ 11]
Hereditary tyrosinemia	FAH	mouse model	CRISPR-Cas9	[ 12]
Duchenne muscular dystrophy	DMD	Germ line of mdx mice	CRISPR-Cas9	[ 13]

diseases within this group would benefit from this technology, and what are the main problems to be addressed to transform this promising technology into reality.

### Lysosomal Storage Disorders

Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of approximately 50 genetically inherited diseases, characterized by total or partial deficiency of one specific enzyme involved in the degradation pathways of macromolecules in the lysosome [ 14]. They are monogenic and for most of them, a large number of mutations have been described. Some mutations cause complete loss of enzyme activity, while others only reduce this activity. Storage of undergraded or partially degraded material, usually the substrate of the defective enzyme, occurs in the lysosome. Conventionally, LSD are grouped based on the chemical nature of the non-degraded substrates that accumulate, including mucopolysaccharidoses, lipidoses, glycoses, and oligosaccharidoses [ 1].

Despite the great heterogeneity of symptoms, most of these diseases are characterized by its progressive course with high morbidity and increased mortality, although there are significant variations between different diseases and among patients with the same disease [ 15]. Generally, these diseases are multisystemic, and clinical features include organomegaly, central nervous system dysfunction, and coarse hair and faces. Most patients are asymptomatic at birth and present the onset during childhood. Their frequency varies in different regions and populations, but although individually rare, the combined estimated prevalence ranges from 1:4000 to 1:9000 live births [ 14].

Although several of these diseases have no specific therapy so far, for some LSD, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and enzyme replacement therapy (ERT) are available, and other approaches, such as gene therapy, are being developed. These treatments are based on the fact that most lysosomal enzymes can be internalized by deficient cells via mannose-6-phosphate receptors. After endocytic internalization, the enzyme is transported by endosomes to the lysosome,

resulting in the breakdown of accumulated storage material [ 16]. However, these treatments are not available to all LSDs, many of them are in the experimental phase, and they are not fully effective and curative.

In HSCT, stem cells from bone marrow or umbilical cord blood from healthy donors are transplanted. Evidence shows that its efficacy relies not only on the migration of donor cells into bone marrow and reconstitution of the blood lineage, but to the subsequent migration of engrafted cells into many disease target organs, including the brain, where they replace the resident enzyme-deficient population; thus becoming a local and steady source of the functional enzyme [ 17]. When successful, HSCT may prolong the patient's life, preserve neurocognition and enhance somatic changes. Major drawbacks of the HSCT include the significant risks associated with this procedure, such as the possibility of developing graft-versus-host disease, the difficulty of finding HLA-compatible donors and development of chimerism [ 18•]. So, its use in many countries has been deferred in favor of ERT whenever it is available.

In ERT, the deficient recombinant enzyme is administered to the patient by means of repeated intravenous injections. Despite being an effective and safe treatment option for various LSD, ERT also has important limitations. Among them are the adverse reactions presented by some patients, the high cost of treatment, the life-long dependence on weekly 4–5-h-long infusions and the limited ability to correct neurological and skeletal pathology [ 19].

Given the limitations presented by existing therapies in the treatment of LSD, investigation of new therapies aiming at increasing treatment effectiveness becomes necessary. Many studies have been developed in this direction, each using a different aspect of the disease to the development of different approaches, among them gene therapy. Gene therapy may overcome some of these problems, as it may allow constant delivery of the enzyme direct to target organs and eliminates the need for weekly infusions. Also, correction of a few cells could lead to the enzyme being secreted into the circulation and taken up by their neighboring cells, resulting in

widespread correction of the biochemical defects. So, the number of cells that must be modified with a gene transfer vector is relatively low [ 15]. Moreover, precise transcriptional regulation is probably not necessary as over-expression of lysosomal enzymes does not appear to be detrimental and as little as 5–10 % normal levels of enzyme can be therapeutic for several LSD [ 20].

Genetic modification can be performed either *ex vivo* or *in vivo*. The *ex vivo* strategy is based on modification of cells in culture and transplantation of the modified cell into patient [ 1]. Cells that are most commonly considered therapeutic targets for monogenic diseases are stem cells. Advances in collection and isolation of these cells from a variety of sources have promoted autologous gene therapy as a viable option for LSD. In mouse models of LSDs, genetically modified neural stem cells encoding for enzyme genes effectively decreased lysosomal storage, reduced pathology, and extended life span of animals [ 21]. Mesenchymal stem cells and inducible plu-ri-potent stem cells (iPSC) are also being used with this pur-pose [ 6, 7, 22]. However, as already mentioned, conventional gene therapy protocols have important limitations; among them are safety issues related to immune response and the possibility of insertional mutagenesis in the case of viral vec-tors, and low efficiency with non-viral vectors.

#### Genome Editing Combined with HSCT: Potential to Treat LSD

The use of endonucleases for targeted genome editing can solve the limitations presented by the usual gene therapy protocols. These enzymes are custom molecular scissors, allowing cutting DNA into well-defined, perfectly specified pieces, in virtually all cell types. Moreover, they can be delivered to the cells by plasmids that transiently express the nucleases, or by transcribed RNA, avoiding the use of viruses [ 23]. This technology, combined with HSCT, may represent a milestone for treatment of LSD. Hematopoietic stem cells extracted from a patient could be transfected with vectors encoding endonucleases designed to cleave at sites near the specific mutation and with a donor vector. The donor vector contains a region homologous to the mutated region, however, with the correct nucleotide sequence, and would serve as a template for repair of DNA damage after the double-strand break. Then, the cells which internalize the two vectors, in which the cleavage and homologous recombination occur, would have the correct gene sequence, and may be selected and implanted back into the patient (Fig. 1). Combining autologous HSCT with nuclease-mediated genome editing would have the advantages of lower risk of infection during the patient's treatment, since the recovery of the immune function is rapid. Also, it would avoid the development of rejection (graft-versus-host disease), since the donor and the recipient are the same individual [ 24].

However, the clinical experience obtained so far with conventional HSCT suggests that the success of this procedure will probably be limited to some LSD. Factors predicting the success of the treatment are generally disease-specific. The main LSD with good evidence of transplant efficacy are Hurler syndrome (MPS I), Hunter syndrome (MPS II), Maroteaux-Lamy syndrome (MPS VI), Sly syndrome (MPS VII), and  $\alpha$ -mannosidosis [ 25]. These diseases would probably be also the ones with greater chance to benefit from the combined treat-ment HSCT + genome editing. Moreover, other LSDs with evidence from limited series that suggest that transplantation may be efficacious, or for which HSCT has not been widely applied, but it may be expected to have some advantage, the combined treatment may have advantages over the HSCT and become an option. In this group, diseases with milder pheno-types, for which HSCT was not formerly offered because of the perceived risk, can be included.

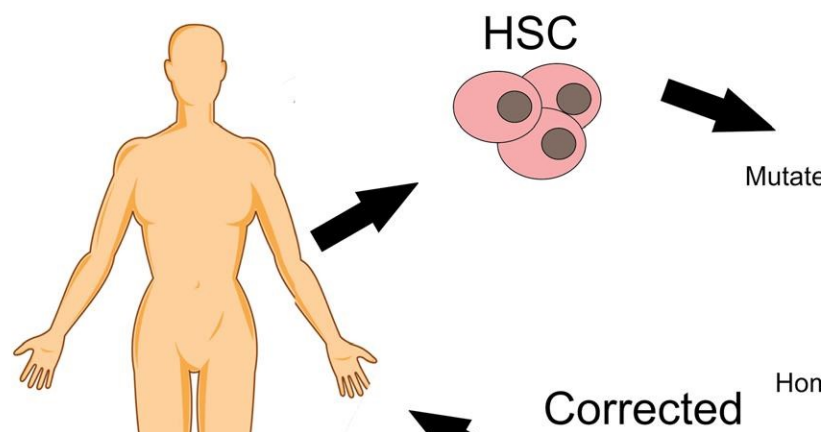
The HSCT is more effective in younger patients [ 18]. Therefore, it is important to consider the time it would take to have the final diagnosis and identification of the mutation, the construction of vectors for site-specific cleavage and homologous recombination, and finally, cell repair and transplantation. Therefore, patients who have common mutations in certain populations could benefit, since the vectors are mutation-specific, and pre-clinical tests would be preferentially performed in these mutations, allowing the acquisition of information regarding correction rates and safety issues, for example. Table 2 shows the LSDs most likely to benefit from treatment with HSCT combined with genome editing, since they are treatable by HSCT and have reported common mutations in some populations.

The proposed strategy has been studied experimentally in other genetic disease models and the results are promising. Genovese et al. used ZFN genome editing in a model of X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1). They showed evidence of targeted integration in human hematopoietic stem cells by long-term multilineage repopulation of transplanted mice. They also demonstrated the therapeutic potential of the strategy by targeting a corrective complementary DNA into the IL2RG gene of HSCs from healthy donors and a subject with SCID-X1. Gene-edited HSCs sustained normal hematopoiesis and gave rise to functional lymphoid cells that possess a selective growth advantage over those carrying disruptive IL2RG mutations [ 5]. The more recent technology of the CRISPR-Cas9 system seems to be even more effective than ZFN and has been used in proof of principle treatment for genetic diseases. This system was used to correct a mutation that causes cystic fibrosis in both patient-derived primary cultured small intestinal cells and large intestinal stem cells. When assayed in organoid culture, disease-associated defects were rescued in these engineered cells [ 33].

Another approach that could be used for LDS is correcting other types of stem cells. Mesenchymal stem cells could be a

Fig. 1 Schematic representation of the proposed treatment.

Hematopoietic stem cells extracted from a patient could be transfected with vectors encoding the tailored endonuclease and with a donor vector to guide the homologous recombination. Then, the corrected cells may be selected ex vivo and implanted back into the patient. HSC hematopoietic stem cells, DBS double strand break



good option for treating specific organs affected by the diseases. These cells can be easily obtained from bone marrow or adipose tissue. After editing their genome, the cells could be expanded in culture and reinserted into the patient to produce differentiated cells with corrected functions. Attempts with other gene therapy strategies have been made to use these cells to treat LSD. Meyerrose et al. (2008) transduced human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with a lentiviral vector expressing  $\beta$ -glucuronidase and transplanted them into the xenotransplant model of MPS VII. Transduced cells persisted in the animals that underwent transplantation for the length of the study (4 months), expressed high levels of enzyme and reduced lysosomal storage in several critical tissues [ 34]. Moreover, studies using inducible pluripotent stem cells (iPSC) demonstrated that it is possible to generate mutations in these cells with the CRISPR-Cas9 system after inducing differentiation, allowing for studies of tissue-specific effects [ 7]. Such studies suggest that, in the future, it may be possible to generate iPSC from patients, correct the causative mutation, differentiate the cells and reintroduce them back into the patient.

#### Pitfalls to be Addressed

The potential of combining autologous HSCT with genome editing in gene therapy for LSD is evident. However, before this technology can be used as treatment for these diseases, some obstacles must be overcome. Some of them are related to hematopoietic stem cells, and are common to other forms of gene therapy on stem cells. After modification, it would be ideal that the selected cells could be expanded in culture before being reimplanted into the patient. Several protocols for expansion of these cells, the majority using cytokines in the culture medium, are being studied and showed good results in mouse cells [ 35]. However, when tested in larger animals or humans, the same protocols do not seem to work well [ 36, 37]. Thus, appropriate clinical expansion protocols are still lacking.

Regarding HSCT, some LSD, including MPS III (Sanfilippo syndrome), Batten disease, and late infantile ceroid lipofuscinosis (LINCL) do not respond to this treatment [ 25]. In these cases, it would be necessary to try to modify

Table 2 List of lysosomal storage diseases treatable with HSCT, their common mutation, and the mutated allele frequency in some populations

LSD	Common mutations	Combined mutant alleles frequency in the population (approximate) (%)	Reference
Aspartylglucosaminuria	p.C163S; c.488G>C	98	[ 26]
Gaucher disease	p.L444P; c.1448T>C	67	[ 27]
Krabbe disease	p.N370S; c.1226A>G c.1161+6532_polyA+9kdel c.1586C>T, c.1700C>T, c.1472delA	60	[ 28]
Lysosomal acid lipase deficiency	p.delS275_Q298; c.894G>A	50–60	[ 29]
$\alpha$ -mannosidosis	p.R750W; c.2248C>T	27	[ 30]
Metachromatic leukodystrophy	c.459+1G>A	25	[ 31]
Mucopolysaccharidosis type I	p.W402X; c.1293G>A p.Q70X; c.296C>T	70	[ 32]

other cell types. Also, the extent of myeloablation and the number of modified cells that would be transplanted must be well studied.

Even though genome editing with nucleases has been applied in many model organisms, there are still fundamental attributes that are unclear and need further investigation. These include molecular aspects of the systems. For example, the ratio of Cas9 to gRNA in the CRISPR-Cas9 system greatly affects mutagenesis efficiency [ 38, 39]. Theoretically, the more complexes are formed, the higher editing efficiency is expected. However, excessive cleavage efficiency can result in off-target breaks, one of the main problems related to nucleases. Unspecific cleavages were reported in several studies, not only using CRISPR-Cas but also for ZFN and TALEN [ 40– 42]. Several methods have been studied to detect these off-target sites and thus improve the selection of cells before use. However, it is important to develop methods to optimize the systems by controlling component expression, improving target selection criteria, and engineering the nucleases to provide higher specificity.

Another area that needs optimization is the delivery of the genetic material to the cells. In the case of hematopoietic cells, for which the protocols for *in vitro* expansion do not work well, it is important that a large fraction of cells taken from the patient is properly modified. This largely depends on the efficiency of transfection. There are different ways of delivery systems for generating active nuclease components (e.g., plasmid-, DNA fragment-, and RNA-based delivery), and the best way must be determined for each cell type. Optimized electroporation and lipofection protocols for each cell type are also crucial to the success of the strategy. Besides being used directly for genome editing [ 43], viral vectors are being used in combination with ZFN, TALEN, and CRISPR-Cas9. For transfection-resistant cell types, the use of viral vectors, such as integrase-deficient lentiviral vectors, adeno-associated virus-derived vectors, or adenoviral vectors, instead of plasmids, can be an option. An integrase-deficient lentivirus vector was successfully used for delivering ZFN into a panel of human cell lines and stem cells [ 44]. However, for TALEN delivery, this method does not seem to be so effective. For this system, adeno-associated virus vectors are indicated [ 45]. Viral vectors are also being used for delivering CRISPR-Cas9 system components. Maggio et al. transduced cells with this combination and observed rates of targeted mutagenesis similar to those achieved by isogenic adenovirus encoding TALEN targeting the same chromosomal region [ 46]. Moreover, factors affecting recombination efficiency, including the characteristics of the mutations, sizes and positions of the homologous flanking arms, and the stability of the given templates before HDR occurs remain to be evaluated.

## Conclusions

The need for new therapies aimed at increasing treatment effectiveness for LSDs is evident, since the few therapeutic options available have important limitations. Combining targeted genome editing and HSCT seems to be a promising strategy to treat some of these diseases, especially those that are responsive to HSCT and have common mutations described. ZFN, TALEN, and CRISPR-Cas9 systems have the potential to correct mutations on specific sites, via double-strand break followed by homologous recombination, and have proven to be efficient in treating other genetic diseases. However, since these technologies are very recent, some obstacles must be addressed. Additional methodological advances both in HSCT and nuclease-mediated genome editing will undoubtedly further enhance the use of these techniques, and make them a possible option for curing LSD.

**Acknowledgments** The authors would like to thank CNPq for financial support.

**Compliance with Ethics Guidelines**

**Conflict of Interest** TG de Carvalho, U Matte, R Giugliani, and G Baldo declare that they have no conflict of interest.

**Human and Animal Rights and Informed Consent** This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

## References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance

1. Matte U, Baldo G, Giugliani R. Non viral gene transfer approaches for lysosomal storage disorders. In: Yuan X, editor. *Non-Viral Gene Therapy* [Internet]. InTech; 2011 [cited 2014 Nov 15]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/non-viral-gene-therapy/non-viral-gene-transfer-approaches-for-lysosomal-storage-disorders>.
2. Baldo G, Giugliani R, Matte U. Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(3):449–59.
3. Wang D, Gao G. State-of-the-Art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med*. 2014;18(98):151–61.
4. DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2013; gkt135.
5. Genovese P, Schirotti G, Escobar G, Di Tomaso T, Firrito C, Calabria A, et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;510(7504):235–40. This study showed that ZFN gene-edited hematopoietic stem cells

- sustained normal haematopoiesis and gave rise to functional cells that possess a selective growth advantage over the mutant cells.
6. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu P-Q, Paschon DE, et al. Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;478(7369):391–4.
  7. Sanders LH, Laganière J, Cooper O, Mak SK, Vu BJ, Huang YA, et al. LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: reversal by gene correction. *Neurobiol Dis*. 2014;62:381–6.
  8. Sun N, Zhao H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111(5):1048–53.
  9. Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, Morio T, Takada S, Mizutani S, et al. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus. *Sci Rep*. 2014;4:5043.
  10. Low BE, Krebs MP, Joung JK, Tsai SQ, Nishina PM, Wiles MV. Correction of the Crb1rd8 allele and retinal phenotype in C57BL/6N mice via TALEN-mediated homology-directed repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(1):387–95.
  11. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res*. 2014;24(9):1526–33.
  12. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014;32(6):551–3.
  13. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science*. 2014;345(6201):1184–8.
  14. Giugliani R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(5):871–7.
  15. Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(5):983–90.
  16. Hollak CEM, Wijburg FA. Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37(4):587–98.
  17. Wilkinson FL, Sergijenko A, Langford-Smith KJ, Malinowska M, Wynn RF, Bigger BW. Busulfan conditioning enhances engraftment of hematopoietic donor-derived cells in the brain compared with irradiation. *Mol Ther*. 2013;21(4):868–76.
  18. Lund TC. Hematopoietic stem cell transplant for lysosomal storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev PER*. 2013;11 Suppl 1:91–8. This review discusses what is currently known of HSCT related outcomes in the treatment of many LSDs.
  19. Baldo G, Mayer FQ, Martinelli BZ, de Carvalho TG, Meyer FS, de Oliveira PG, et al. Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organ sinus mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab*. 2013;109(1):33–40.
  20. Hawkins-Salsbury JA, Reddy AS, Sands MS. Combination therapies for lysosomal storage disease: is the whole greater than the sum of its parts? *Hum Mol Genet*. 2011;20(R1):R54–60.
  21. Shihabuddin LS, Cheng SH. Neural stem cell transplantation as a therapeutic approach for treating lysosomal storage diseases. *Neurotherapeutics*. 2011;8(4):659–67.
  22. Reiser J, Zhang X-Y, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(12):1571–84.
  23. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347–55.
  24. Montiel-Equihua CA, Thrasher AJ, Gaspar HB. Gene therapy for severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *Curr Gene Ther*. 2012;12(1):57–65.
  25. Wynn R. Stem cell transplantation in inherited metabolic disorders. *ASH Educ Program Book*. 2011;2011(1):285–91.
  26. Valkonen S, Hietala M, Savontaus ML, Aula P. Origin of Finnish mutations causing aspartylglucosaminuria. *Hereditas*. 1999;131(3):191–5.
  27. Giraldo P, Alfonso P, Irún P, Gort L, Chabás A, Vilageliu L, et al. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):17.
  28. Tappino B, Biancheri R, Mort M, Regis S, Corsolini F, Rossi A, et al. Identification and characterization of 15 novel GALC gene mutations causing Frabbe disease. *Hum Mutat*. 2010;31(12):E1894–915.
  29. Bernstein DL, Hülkova H, Bialer MG, Desnick RJ. Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol*. 2013;58(6):1230–43.
  30. Riise Stensland HMF, Klenow HB, Nguyen LV, Hansen GM, Malm D, Nilssen Ø. Identification of 83 novel alpha-mannosidosis-associated sequence variants: functional analysis of MAN2B1 missense mutations. *Hum Mutat*. 2012;33(3):511–20.
  31. Berger J, Löschl B, Bernheimer H, Lugowska A, Tytki-Szymanska A, Gieselmann V, et al. Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase a mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *Am J Med Genet*. 1997;69(3):335–40.
  32. Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med*. 2003;5(4):286–94.
  33. Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):653–8.
  34. Meyerrose TE, Roberts M, Ohlemiller KK, Vogler CA, Wirthlin L, Nolte JA, et al. Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xeno-transplantation model of human disease. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008;26(7):1713–22.
  35. Watts KL, Adair J, Kiem H-P. Hematopoietic stem cell expansion and gene therapy. *Cytotherapy*. 2011;13(10):1164–71.
  36. De Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson BS, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(9):771–8.
  37. Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, et al. Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood*. 1998;92(4):1131–41.
  38. Xu T, Li Y, Nostrand JDV, He Z, Zhou J. Cas9-based tools for targeted genome editing and transcriptional control. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(5):1544–52.
  39. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910–8.
  40. Guilinger JP, Pattanayak V, Reyon D, Tsai SQ, Sander JD, Joung JK, et al. Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nat Methods*. 2014;11(4):429–35.
  41. Grau J, Boch J, Posch S. TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013;29(22):2931–2.
  42. Fine EJ, Cradick TJ, Bao G. Identification of off-target cleavage sites of zinc finger nucleases and TAL effector nucleases using



- predictive models. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1114:371–83.
43. Ian E. Alexander, David W. Russell. The potential of AAV-mediated gene targeting for gene and cell therapy applications. *Curr Stem Cell Rep*. 2015;in press.
  44. Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee Y-L, Kim KA, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1298–306.
  45. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):e63.
  46. Maggio I, Holkers M, Liu J, Janssen JM, Chen X, Gonçalves MAFV. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep*. 2014;4:5105.

#### **4.2. Artigo II: A simple and efficient protocol for transfecting mesenchymal stem cells**

Artigo a ser submetido para a revista “Genetics and Molecular Biology”

## **A simple and efficient protocol for transfecting mesenchymal stem cells**

Talita Giacomet de Carvalho<sup>1,2</sup>

Felipe Matheus Pellenz<sup>1</sup>

Alvaro Laureano<sup>3</sup>

Lucia Mariano da Rocha Silla<sup>3</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

Guilherme Baldo<sup>1,2</sup>

Ursula Matte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Cellular Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author:

Guilherme Baldo

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8838

## **Abstract**

Mesenchymal stem cells (MSC) are being considered as potential targets for cell and gene therapy-based approaches against a variety of different diseases. The MSC from bone marrow are a promising target population as they are capable of differentiating along multiple lineages and have significant expansion capability. These characteristics makes them strong candidates for delivering genes and restoring organ systems function. However, as other primary cells, MSC are difficult to transfect. In order to standardize a simple and efficient protocol for transfection of MSC, we conducted a series of experiments and achieved a protocol that does not require the use of viral particles or specific expensive equipment and reagents. Here we report an optimized protocol for MSC transfection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup>, that yields good transfection efficiencies for human MSC (up to 26%), and is rapid, simple and safe.

## **Introduction**

Stem cell therapy has opened up new possibilities for the field of regenerative medicine and cellular therapy. Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent adult stem cells that have been widely studied and utilized. Among the reasons are the ease of isolation from a wide range of adult and neonatal tissues, including bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and amniotic fluid (Amorin et al., 2014). They have the ability of self-renewal, can be expanded to a large scale in culture without losing its stem cell properties, and can differentiate into mesodermal derivatives, such as adipocytes, osteocytes and chondrocytes (7). Also, MSC have a natural capacity to immune protect injured tissues (Kim et al., 2016) and inhibit immune surveillance (Han et al., 2012), thus allowing for tissue regeneration through the production and release of immunomodulatory molecules.

Advances in stem cell and molecular biology have opened up new possibilities for manipulating the fate and the functionality of MSC. As these cells show tropism for sites of injury (Han et al., 2012), they represent an ideal vehicle to express therapeutic proteins. Genetic engineering, with a wide variety of methods to induce gene expression in a precise and controllable manner, is particularly attractive. By delivering the

inductive genes, MSC could be guided to differentiate towards the desired lineages and could serve as a gene/drug delivery carrier after (Uchibori et al., 2014).

However, when considering the use of MSC in genetic engineering, many practical problems should be resolved, among which is the lack of a safe and efficient method of gene delivery (Santos et al., 2011; Wang et al., 2014). One widely used method is electroporation. This uses a pulsed electrical field to make the cell membrane permeable and allow the entry of DNA into both dividing and nondividing cells. Although several reports have shown electroporation to be a high efficient method, most of these reports rely on a specific electroporator, with preset programs and unique electroporation buffers (Zeitelhofer et al., 2007).

Viral-based vectors are currently the most commonly used methods to deliver genes to almost all types of cells (Lukashev and Zamyatnin, 2016), as in general they allow a high efficient gene delivery and consequently a sustained gene expression. However, these vectors suffer from serious safety issues such as immunogenicity and oncogenesis. Non-viral vectors are generally regarded as safer alternatives, are easier to produce and manufacture in large-scale, and can carry large therapeutic genes, thus being a more attractive option from a clinical point of view (Matte et al., 2011a). Among the non-viral methods available, Lipofectamine<sup>®</sup>, a cationic lipid-based reagent, has provided successful transfection to a wide range of mammalian cell lines using a simple protocol (Schenborn and Oler, 2000). The positively charged lipids interact electrostatically with nucleic acids (negatively charged), forming complexes that facilitate the internalization of the exogenous genetic material by the cell through endocytosis (Wasungu and Hoekstra, 2006). However, despite these advantages, this system still generally shows low to moderate gene transfer efficiency in MSC, a cell type known to be difficult to transfect (Wang et al., 2014).

Here we report an optimized protocol for MSC transfection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup>. The method yields good transfection efficiencies for human MSC (up to 26%), is rapid, simple and safe.

## **Materials and methods**

### *Human mesenchymal stem cells isolation and culture*

Human cell samples were obtained from healthy donors for hematopoietic stem cells transplantation after informed donor consent under protocols approved by the ethical review board from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Discharged bags and filters of BM aspirates were obtained, and total nucleated cells were isolated by elution with saline (0.9% NaCl, Baxter, SP, Brazil). The cells were then centrifuged and the pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% platelet lysate (Doucet et al., 2005) and 1% penicillin/streptomycin, and were maintained under normal tissue culture conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere). Medium was replaced every 3–4 days.

### *Characterization of MSC*

MSC were identified by surface antigen marker evaluation using flow cytometry. Briefly, cells were detached with trypsin/EDTA and incubated with the isotype control and specific antibodies (CD105 PE, CD45 FITC, CD73 PE, CD14 FITC, CD90 PE, HLA-DR FITC, CD29 PE, CD34 PE) (Becton, Dickinson and Company, USA) in the appropriate combinations. The cells were then incubated for 30 min at 4°C, protected from light, washed, resuspended in 0.5 mL PBS and assayed in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson).

To analyze the differentiation potential of the cells *in vitro*, they were seeded on 12 well plates at  $0,5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 2 weeks with adipogenic, osteogenic or chondrogenic differentiation medium (StemPro<sup>®</sup>, Thermo Fischer Scientific, USA). To check for calcium deposition, presence of lipids, and sulfated glycosaminoglycans, cells were fixed in 10% formalin and stained with Alizarin Red S (Merck, Germany), Oil Red-O (Merck, Germany) and Alcian blue (Sigma, USA), respectively.

### *Plasmid preparation*

The enhanced green fluorescent protein (eGFP)-expressing plasmid pIRES2-EGFP (5.3 kb, Life Technologies, USA) was used for the experiments. The concentration of purified pDNA solutions was assayed by spectrophotometry at 260 nm (Nanodrop, Thermo Scientific), and DNA integrity was confirmed using DNA agarose gel stained with Sybr Gold (Thermo Fischer Scientific, USA).

### *MSC transfection*

For electroporation, two cell concentrations were tested,  $0.5 \times 10^6$  and  $1 \times 10^6$ , using a protocol described by Helledie et al. (2008). Cells were resuspended in OPTI-MEM, transferred to a 4 mm electroporation cuvette, mixed with 60  $\mu$ g of plasmid DNA and electroporated using Gene Pulser XCell (BioRad, USA), with an exponential program and the following settings: 350 V, 950  $\mu$ F and 200  $\Omega$ . After electroporation, cells were incubated for 5 min at room temperature and transferred to tissue culture plates in maintenance media. After 24 h, media were changed to remove debris and dead cells.

For transfection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup> (Life Technologies, USA), cells were plated in 24-well plates and cultured with DMEM supplemented with 10% platelet lysate and 1% penicillin/streptomycin, and maintained under normal tissue culture conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere) for 24 hours before transfection. Three different Lipofectamine 3000<sup>®</sup> reagent volumes (0.75, 1.5 and 3.0  $\mu$ L) and three quantities of plasmid DNA (0.5, 1.0 and 1.5  $\mu$ g) were compared. After establishing the best conditions, five cell concentrations were tested. With the best cell concentration, four cell passages were compared. The protocol was performed according to the supplier's instructions. Briefly, plasmid DNA was mixed with OPTI-MEMI (Life Technologies, USA) and the P3000 reagent (Life Biotechnologies, USA) in a microcentrifuge tube. In a separate tube, Lipofectamine 3000<sup>®</sup> reagent was diluted in OPTI-MEM. The contents of the two tubes were then combined by gentle pipetting and incubated at room temperature for 5 min, allowing the formation of DNA/lipid complexes. Then the transfection mixture was added to the cells in culture. All transfection experiments were performed in triplicate.

### *Flow cytometry*

Forty-eight hours after transfection, cells were harvested using trypsin and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). The percentage of GFP-expressing cells was determined by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) using BD FACSDiva software. First, an FSC/SSC gate was delineated in order to define a live gate analysis, and then a gate in the FL1-FL3 plot was set to exclude all GFP-negative cells. Nonspecific fluorescence was determined using the nontransfected cells. For each sample, 10,000 events were acquired.

### *Data analysis*

All data is presented as mean – standard deviation. Statistical significance was determined by one way ANOVA or Kruskal Wallis test and set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

To establish a quick and efficient transfection protocol for human MSC, two methods with different variations were tested: conventional electroporation and lipofection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup>. Gene delivery was evaluated by measuring the expression of the eGFP reporter gene encoded by the plasmid used.

After MSC characterization, electroporation was performed using a previously described protocol (Helledie et al., 2008) with two different cell concentrations. The cells were transfected with the same parameters and examined by flow cytometry for fluorescence detection 48 h after transfection. The groups with higher initial number of transfected cells ( $1 \times 10^6$  cells) showed more intense fluorescence than the other group ( $0.5 \times 10^6$ ) ( $P < 0.05$ ) (Figure 1). Although showing relative efficiency, this protocol requires a large number of cells for each transfection, and presents high cell mortality determined by a high number of floating dead cells in the culture media.

In order to optimize an alternative protocol with better transfection efficiency in human MSC, different DNA/lipid ratios, cell confluence and number of cell passages were tested and compared. Fluorescence intensity was quantified by flow cytometry 48 hours after transfection. In the first experiments, three different lipid volumes were tested, 0.75, 1.5 and 3.0  $\mu\text{L}$  per well, with different DNA quantities. The lower volume



(0.75  $\mu\text{L}$ ) of lipid was tested with two DNA quantities: 0.5 and 1.0  $\mu\text{g}$ . The larger lipid volume (1.5  $\mu\text{L}$ ) was combined with 0.5, 1.0 and 1.5  $\mu\text{g}$  of DNA, and the highest lipid volume (3.0  $\mu\text{L}$ ) was mixed with 1.0 and 1.5  $\mu\text{g}$  of lipid DNA. The results from these experiments showed better transfection efficiency for four lipid/DNA ratios: 0.75/0.5, 1.5/0.5, 1.5/1.0 and 3.0/1.0. The lipid volume of 1.5  $\mu\text{L}$  appears to be better than the other two lipid volumes tested, demonstrating higher transfection efficiency with 0.5 and 1.0  $\mu\text{g}$  of DNA (Figure 2).

So the next experiment, to test the influence of cell confluency in the transfection efficiency, was performed with two lipid/DNA relations: 1.5  $\mu\text{L}/0.5 \mu\text{g}$  and 1.5  $\mu\text{L}/1.0 \mu\text{g}$ . Five different number of cells were plated 24 hours before transfection:  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $0.5 \times 10^5$ ,  $0.25 \times 10^5$  and  $0.12 \times 10^5$ . The highest fluorescence intensities were detected in the three groups with lower cell confluence ( $0.5 \times 10^5$ ,  $0.25 \times 10^5$  and  $0.12 \times 10^5$  cells). In these groups, the lipid/DNA ratio 1.5  $\mu\text{L}/0.5 \mu\text{g}$  also showed to be more efficient (Figure 3). For the first two sets of experiments, cells at passages 2-3 were used. The next tests were conducted to check the influence of the number of cell passages in transfection efficiency. MSC at passages 4, 6, 8 and 9 were tested. Each cell passage was tested with two lipid/DNA ratios (1.5/0.5 and 1.5/1.0) and at three different cells confluences ( $1.0 \times 10^5$ ,  $0.5 \times 10^5$  and  $0.25 \times 10^5$  cells plated).

To confirm that MSC at late passages still maintained their stem cell characteristics, passage 9 cells were plated and subjected to adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation protocols. After incubation for two weeks with the specific medium, cells were submitted to staining protocols for adipocytes, osteocytes or chondrocytes. Differentiated cells were observed for all three protocols. (Supplemental figure 1). However, the transfection protocols performed on cells with late passages did not show good results. In general, the greater the number of cell passages, the lower the transfection efficiency (Figure 4).

Before being subjected to fluorescence detection by flow cytometry, the cells were observed under an optical microscope to check cell morphology. No obvious alterations were observed in any of the tested protocols.

## Discussion

In the past years, MSC have been extensively studied and used in genetic engineering with promising results. Genetic modification of these cells can be used as a tool for studying their molecular and biological mechanism and therefore accelerate their use in clinical applications. However, as other primary cells, MSC are known to be difficult to transfect. In order to standardize a simple and efficient protocol for transfection of MSC, we conducted a series of experiments and achieved a protocol that does not require the use of viral particles or specific expensive equipment and reagents.

We first tested an electroporation protocol. Probably due to differences in cells, DNA, or equipment, we did not obtain the same results described by Helledie et al (2008). The authors reported having achieved up to 80% of transfected cells, whereas with the same protocol, we got up to 18% of transfected MSC. In addition, large cell mortality was observed, determined by a high number of floating dead cells in the culture media. This was not observed for lipofection protocols.

We then tested different conditions to standardize lipofection transfection. Lipofection is one of the most widely used nonviral methods to deliver nucleic acid to a great variety of cells (Fiume et al., 2016). We compared different conditions for transfection of human MSC with the reagent Lipofectamine 3000<sup>®</sup>. First, we tested different lipid/DNA ratios. A large amount of research has been conducted with the aim of defining physicochemical characteristics of liposome/DNA complexes leading to better transfection efficiency. Overall, it can be only concluded that characteristics of lipid/DNA complexes influence the efficiency of liposomes as delivery systems and additionally influence each other (Brgles et al., 2012). Since the best ratio can vary widely for each cell type, we tested seven conditions and determined the best two, that were then used in the subsequent experiments.

The next experiments were performed to verify if cell confluence at the time of transfection could have great influence on the results. Five different cell numbers were tested, and the results showed that the three conditions of lower cell confluence showed better results than the two with the highest number of cells. This is probably because the wells with a larger number of cells were nearly 100% confluent, while the other cells had space and therefore cell division rate was higher. Lipofection is dependent on both cell division and endocytosis rate (Gresch et al., 2004). In dividing cells, the exogenous DNA may reach the nucleus by being trapped in the reassembling nuclear envelope

following mitosis. Usually, as MSCs are rare in their niches, they have to be cultivated for several passages in order to reach clinically relevant cell numbers. Thus, the influence of MSC passage number on transfection efficiency was studied herein. We conducted the same protocol in cells from passages 4, 6, 8 and 9, and observed a decrease in transfection efficiency, especially in cells from passages 8 and 9. Other studies had already observed this decrease in transfection efficiency in MSC in later passages. Interestingly, this decreased efficiency in later passages did not correlate to a decrease in cell's ability to differentiate. However, it is worth noticing that differentiation efficiency was not directly compared between earlier and later passages in this study. Anyway, the higher transfection efficiency observed at lower passages may be the result of a higher nuclear uptake and/or a more efficient transcription/translation of the eGFP gene (Madeira et al., 2010).

## **Conclusion**

In summary, we have demonstrated a simple optimized protocol with Lipofectamine 3000<sup>®</sup> that can improve MSC transfection efficiency. To our optimized protocol, MSC at early passages are plated at low density to achieve confluence of approximately 70% after 24 hours, when they will be transfected using a ratio lipid/DNA of 3.0  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ . With this protocol, we could achieve up to 26% of cells expressing eGFP fluorescence (Figure 5) 48 hours after transfection, which is a reasonable number for this type of cells.

**Acknowledgments:** The authors thank to FIPE/HCPA and CNPq for financial support.

## **References**

- Amorin, B., Alegretti, A.P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A.M., da Silva, M.A.L., Wieck, A., and Silla, L. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum. Cell* 27, 137–150.
- Brgles, M., Šantak, M., Halassy, B., Forcic, D., and Tomašić, J. (2012). Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency. *Int. J. Nanomedicine* 7, 393–401.

- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., and Lataillade, J.-J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* *205*, 228–236.
- Fiume, G., Di Rienzo, C., Marchetti, L., Pozzi, D., Caracciolo, G., and Cardarelli, F. (2016). Single-cell real-time imaging of transgene expression upon lipofection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *474*, 8–14.
- Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Körner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., et al. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods San Diego Calif* *33*, 151–163.
- Han, Z., Jing, Y., Zhang, S., Liu, Y., Shi, Y., and Wei, L. (2012). The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci.* *2*, 8.
- Helledie, T., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2008). A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *17*, 837–848.
- Kim, A., Yu, H.Y., Heo, J., Song, M., Shin, J.-H., Lim, J., Yoon, S.-J., Kim, Y., Lee, S., Kim, S.W., et al. (2016). Mesenchymal stem cells protect against the tissue fibrosis of ketamine-induced cystitis in rat bladder. *Sci. Rep.* *6*, 30881.
- Lukashev, A.N., and Zamyatnin, A.A. (2016). Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochem. Biokhimiia* *81*, 700–708.
- Madeira, C., Mendes, R.D., Ribeiro, S.C., Boura, J.S., Aires-Barros, M.R., da Silva, C.L., and Cabral, J.M.S. (2010). Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*.
- Matte, U., Baldo, G., and Giugliani, R. (2011). Non Viral Gene Transfer Approaches for Lysosomal Storage Disorders. In *Non-Viral Gene Therapy*, X. Yuan, ed. (InTech), p.
- Santos, F. dos, Andrade, P.Z., Abecasis, M.M., Gimble, J.M., Chase, L.G., Campbell, A.M., Boucher, S., Vemuri, M.C., Silva, C.L. da, and Cabral, J.M.S. (2011). Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng. Part C Methods* *17*, 1201–1210.
- Schenborn, E.T., and Oler, J. (2000). Liposome-mediated transfection of mammalian cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *130*, 155–164.
- Uchibori, R., Tsukahara, T., Ohmine, K., and Ozawa, K. (2014). Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells. *Int. J. Hematol.* *99*, 377–382.
- Wang, W., Xu, X., Li, Z., Lendlein, A., and Ma, N. (2014). Genetic engineering of mesenchymal stem cells by non-viral gene delivery. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* *58*, 19–48.

Wasungu, L., and Hoekstra, D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *116*, 255–264.

Zeitelhofer, M., Vessey, J.P., Xie, Y., Tübing, F., Thomas, S., Kiebler, M., and Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat. Protoc.* *2*, 1692–1704.

## Figure legends

**Figure 1:** Electroporation of MSC. Two different cell concentrations were electroporated with the same parameters and examined by flow cytometry for eGFP fluorescence detection 48h after transfection. Results are presented as mean  $\pm$  SEM of experiments with triplicates. \*Student's t test,  $p > 0.05$

**Figure 2:** Effect of lipid/DNA ratio on transfection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup>. Forty-eight hours after transfection, the best efficiency was obtained with four lipid/DNA ratios: 0.75/0.5, 1.5/0.5, 1.5/1.0 and 3.0/1.0.

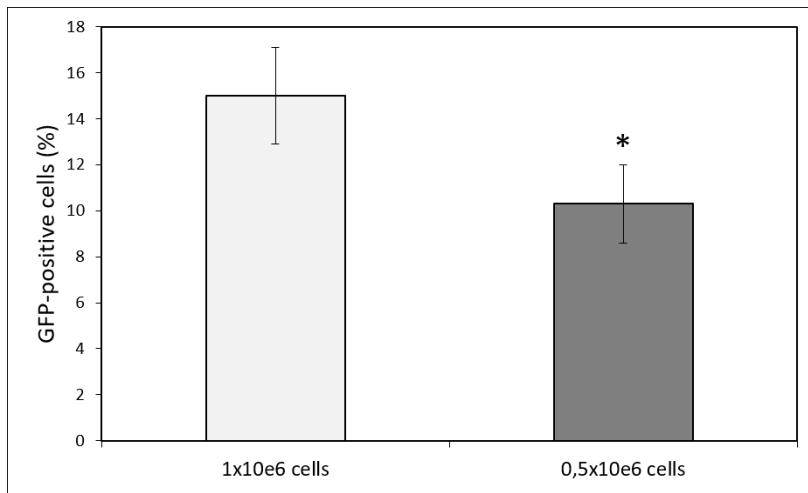
**Figure 3:** Effect of cell confluency on transfection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup>. The highest fluorescence intensities were detected in the three groups with lower cell confluence ( $0.5 \times 10^5$ ,  $0.25 \times 10^5$  and  $0.12 \times 10^5$  cells). In these groups the lipid/DNA ratio 3.0  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  also showed to be more efficient.

**Figure 4:** Effect of cell passage number on transfection with Lipofectamine 3000<sup>®</sup>. MSC at passages 4, 6, 8 and 9 were tested. Each cell passage was tested with two lipid/DNA ratios (3.0  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  and 1.5  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ ) and at three different cells confluences ( $1.0 \times 10^5$ ,  $0.5 \times 10^5$  and  $0.25 \times 10^5$  cells plated). In general, the greater the number of cell passages, the lower the transfection efficiency.

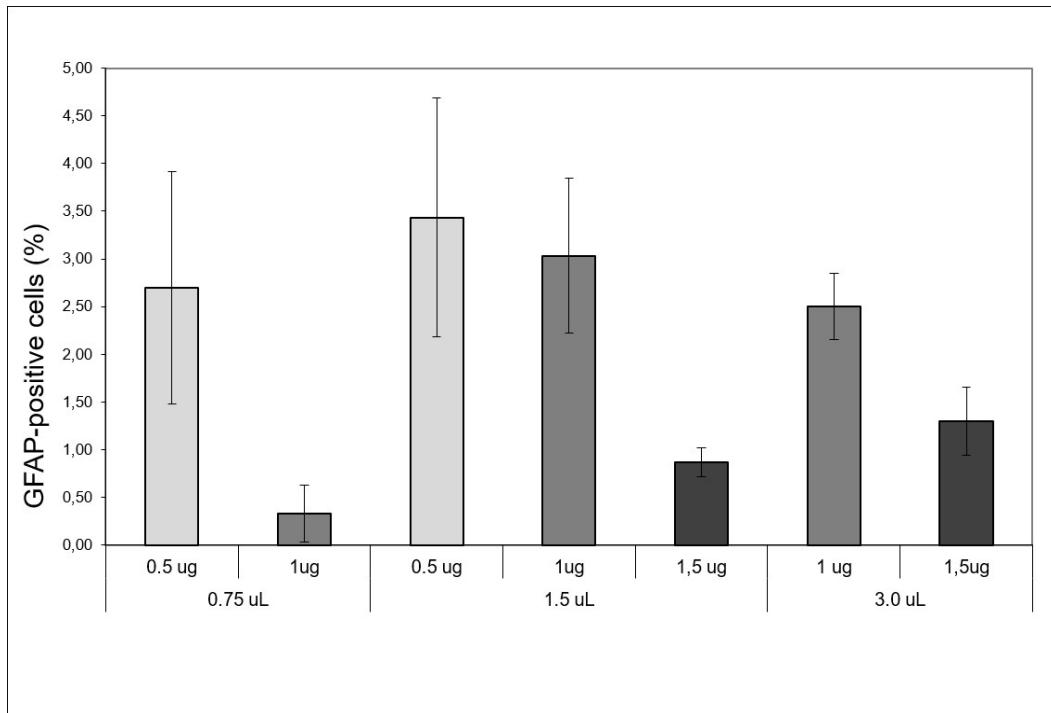
**Figure 5:** Representative histogram from the protocol with better transfection efficiency: MSC at sixth passage, with approximately 70% of confluence, transfected using a ratio lipid/DNA of 3.0  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ .

**Supplemental figure 1:** Plasticity of MSC at passage 9 grown under our conditioned media for differentiation into A) osteoblasts (in alizarin red staining), B) adipocytes (in oil red O staining), and (c) chondrocytes (in alcian blue staining). 20x magnification

**Figure 1**

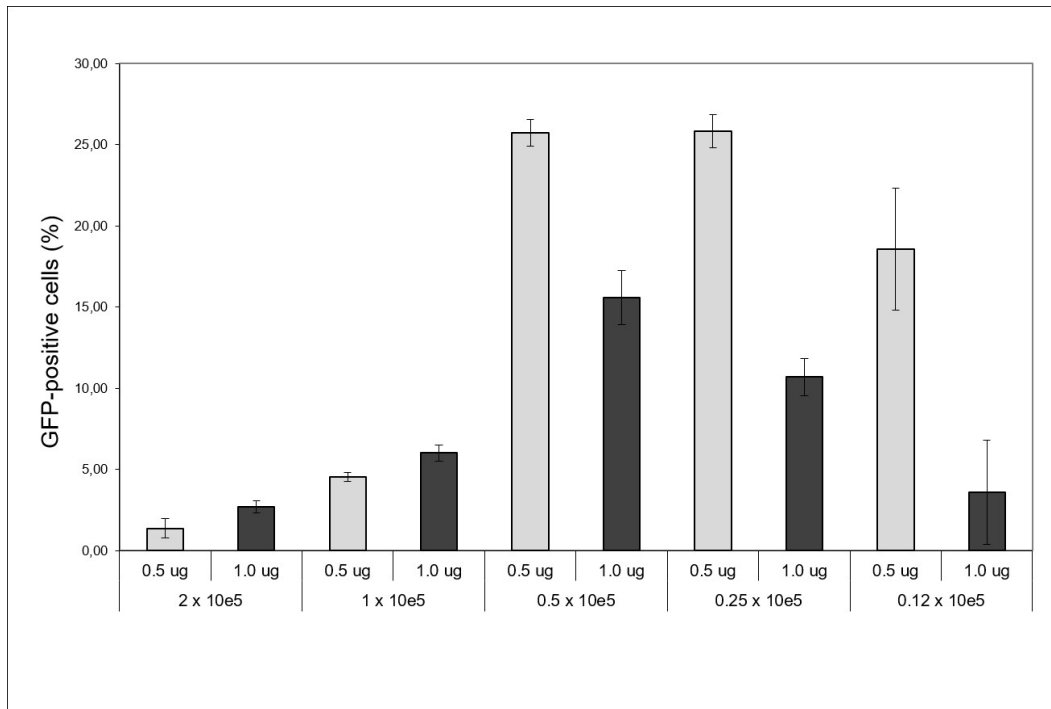


**Figure 2**

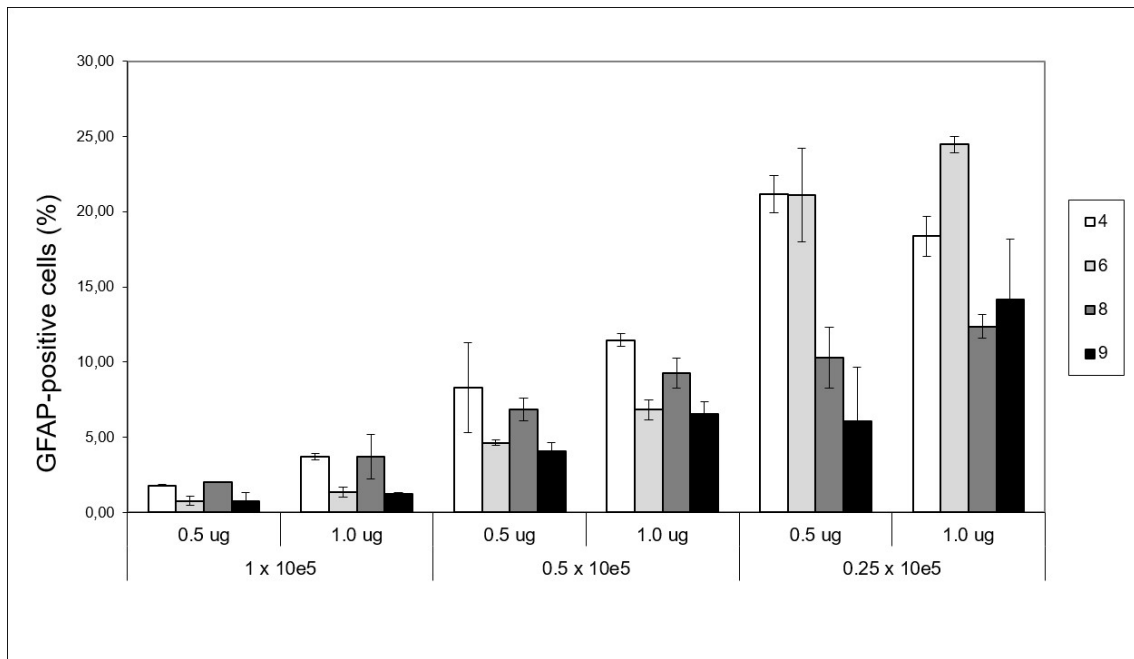




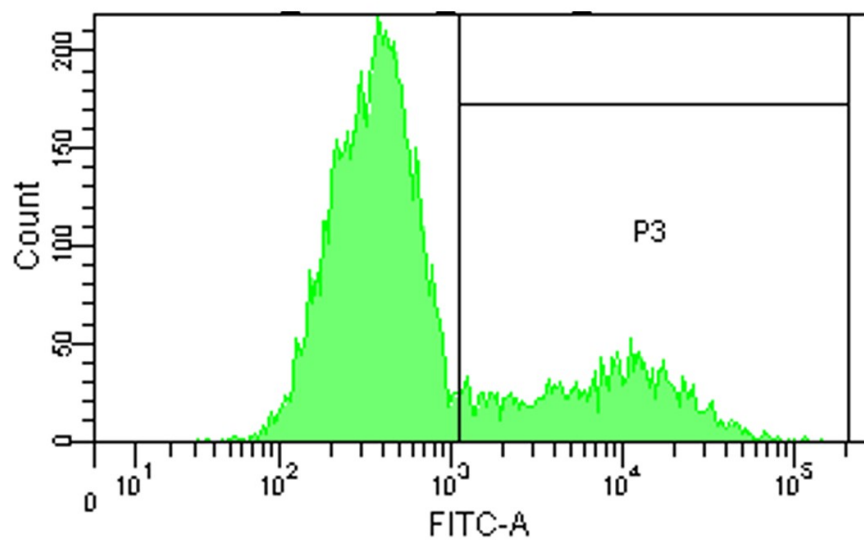
**Figure 3**



**Figure 4**

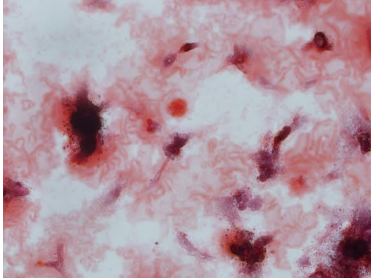


**Figure 5**

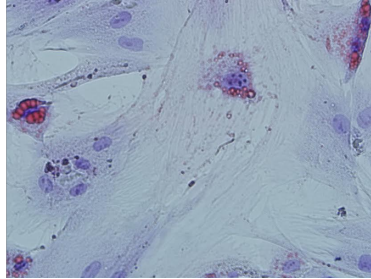


## Supplementary figure 1

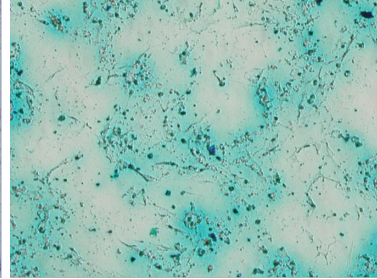
A) Osteoblasts



B) Adipocytes



C) Chondroblasts



**4.3. Artigo 3: Gene editing using the CRISPR-Cas9 system in human MPS I fibroblasts**

Artigo a ser submetido para a revista “Gene Therapy”.

## Gene editing using the CRISPR-Cas9 system in human MPS I fibroblasts

Talita Giacomet de Carvalho<sup>1,2</sup>

Roselena Silvestri Schuh<sup>1,3</sup>

Gabriela Pasqualim<sup>1,2</sup>

Felipe Matheus Pellenz<sup>1</sup>

Eduardo Cremonese Filipe Chiela<sup>4</sup>

Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

Guilherme Baldo<sup>1,2</sup>

Ursula da Silveira Matte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Post-Graduation Program on Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Post-Graduation Program in Hepatology and Gastroenterology, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Guilherme Baldo

Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8838

## **Abstract**

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal storage disorder caused by mutations in the *IDUA* gene, which leads to accumulation of the glycosaminoglycans dermatan and heparan sulfate. The CRISPR-Cas9 system is a new and powerful tool that allows gene editing in precise points of the genome, thus allowing gene correction when a normal sequence is provided along with the system. In this study we used genome editing technology with CRISPR-Cas9 to correct *in vitro* one of the most common mutations in MPS I patients, responsible for severe MPS I phenotype. Human fibroblasts homozygous for p.W402X were transfected and analyzed at up to one month after treatment. IDUA activity was significantly increased, there was a decrease in lysosomal number and next generation sequencing confirmed that a percentage of cells bore the normal sequence, confirming that the pathogenic mutation was corrected in these cells. This study is proof-of-concept that genome editing with CRISPR-Cas9 may be used for correction of mutations responsible for MPS I, and opens the possibility of using this technology as a new therapeutic approach in lysosomal storage disorders.

## **Introduction**

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency of the lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76); which leads to accumulation of its catabolic substrates dermatan and heparan sulfate (D'Aco et al, 2012). Its deficiency leads to progressive accumulation of undegraded or partially degraded substrate within lysosomes, leading to an increase in the number and size of these organelles. This alters cellular homeostasis, with subsequent multiorgan dysfunction (Campos and Monaga, 2012). It is a chronic and progressive disease with heterogeneous clinical manifestations, historically classified in three main phenotypes: severe Hurler (OMIM #67014), intermediary Hurler-Scheie (OMIM #607015) and the attenuated Scheie syndrome (OMIM # 67016).

In humans the *IDUA* gene is approximately 2.1 kb in length and has 14 exons, producing a precursor protein of 653 amino acids (Scott et al., 1992). The enzyme has an initial size of 73 kDa and is processed to a 69 kDa mature form (AtçEken et al., 2016). To date, 222 different disease-causing *IDUA* gene mutations have been reported (<http://www.hgmd.org>), with variable distribution across populations. Overall, the most commonly reported mutations worldwide have been the nonsense mutations p.W402X and p.Q70X, which correspond to about 70% of mutated alleles in Brazilian patients (Matte et al., 2003). The p.W402X allele has a frequency of approximately 50% in northern Europe, the United Kingdom, North America, and Spain (AtçEken et al., 2016). This mutation leads to the production of a truncated protein and has been associated, in homozygous form, to severe Hurler syndrome (Terlato and Cox, 2003).

Currently there are two treatment options for MPS I: enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), but none is fully effective and curative. Genome editing technologies have recently created new possibilities for treatment of genetic diseases by making precise genome modifications possible in cultured cells and in animal studies (Genovese et al., 2014; Long et al., 2014; Xie et al., 2014). CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) /Cas (CRISPR-associated) genome editing system uses the Cas9 nuclease to induce a double strand break (DSB) at DNA sequences targeted by a single guide RNA (gRNA) (Gupta and Musunuru, 2014). The cleaved DNA is subsequently repaired by mammalian DNA repair mechanisms. Therefore, in the presence of a DNA template similar to the target sequence, exogenous DNA can be inserted via homology-directed repair (HDR) (Ledford, 2016). This system can be used to directly correct disease-causing genetic mutations and may be a preferred approach for a treatment to restore stable expression of *IDUA* (Carvalho et al., 2015). Here we have applied CRISPR-Cas9 system to correct p.W402X in cultured human fibroblasts homozygous for this mutation.



## Materials and Methods

### *Vectors*

The PrecisionXTM CRISPR/Cas9 SmartNuclease system (System Biology, USA) was used for genome editing experiments. In this system, the Cas9 nuclease and guide RNA formed by a crRNA-tracrRNA transcript are present in a single vector. A 20 bp target sequence adjacent to a NGG (PAM sequence) which is 14 nucleotides distant from the mutated base on p.W402X was selected with the aid of an online software (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>) (Figure 1A). Sense and antisense oligonucleotides were synthesized, annealed and ligated to the vector that encodes the Cas9. The plasmid was grown in transformed *Escherichia coli* Top 10 (Life Technologies, USA) using standard procedures and isolated using MaxiPrep High Purity columns (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted plasmid DNA was then sequenced by Sanger method to verify the correct orientation of the insert (Figure 1B).

For targeted recombination, a 143 base oligonucleotide homologous to the p.W402X region was synthesized with the base that is changed in this mutation replaced by the correct nucleotide (called donor oligonucleotide). To avoid cleavage of the oligonucleotide by Cas9, as it contains the target region recognized by the nuclease, the PAM sequence in the donor oligonucleotide was modified by a C→A transversion creating a silent mutation on codon p.Q407 that could also be used as a marker of gene editing (Figure 1C).

### *Cell culture and transfection*

All the cells were obtained from patients under informed consent and the project was approved by the local ethics committee. Skin fibroblasts homozygous for p.W402X and one normal control were maintained in culture with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA), in a humidified CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Fibroblasts at passages 3-8 were plated (2x10<sup>4</sup> cells in each well of a 12-well plate) and cultured for 24 hours. Cells were transfected with

Lipofectamine 3000 (Life Technologies, USA), according to the supplier's instructions. Briefly, DNA (0.5 µg of Cas9 vector and 0.5 µg of donor oligonucleotide per well) was mixed with OPTI-MEM (Life Technologies, USA) and P3000 reagent in a microcentrifuge tube. In a separate tube, Lipofectamine 3000 reagent (7.0 µL per well) was diluted in OPTI-MEM. The contents of the two tubes were then combined by gentle pipetting and incubated at room temperature for 5 min, allowing the formation of DNA/lipid complexes. After five minutes, the transfection mixture was added to the cells. Different sets of experiments were performed to analyze cells in different times.

#### *Enzyme assay*

At 48 hours, 7 or 30 days after transfection, fibroblasts were harvested with trypsin, centrifuged, and resuspended in distilled water. After vortex, cells were centrifuged and the supernatant was used to assess IDUA activity. Enzyme assay was performed by incubating the protein extracts with the fluorescent substrate 4-methylumbelliferylalpha-L-iduronide (Glycosynth, Germany) at 37 °C for 1 h in formate buffer (pH 2.8). Reaction was stopped with glycine buffer and fluorescence was measured with 365 nm (excitation) and 450 nm (emission) on a fluorescence spectrophotometer, (SpectraMax, Molecular Devices). Results for cells were calculated in nmol/h/mg protein and shown as percentage of IDUA activity measured in normal fibroblasts. Results for culture medium are expressed as nmol/h/mL medium. Protein content was quantified using the method described by Lowry.

#### *CytoPainter LysoDeep Red Indicator labeling*

To evaluate lysosome number and size, at 48 hours, 7 or 30 days after transfection, treated fibroblasts, MPS I untreated fibroblasts and normal controls were labeled with the fluorogenic probe CytoPainter LysoDeep Red Indicator Reagent (Abcam, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with dye for 30 minutes at 37 °C and then washed in Hank's Balanced Salt Solution with 20 mM Hepes buffer (HHBS). Part of the cells were analyzed for fluorescence intensity by flow cytometry and other part was fixed in 4 % paraformaldehyde for 15 minutes and observed under a confocal microscope (Leica, Germany).

### *Flow cytometry*

After incubation with the lysosome dye mentioned above, live cells were resuspended in HHBS and analyzed for fluorescence intensity levels by flow cytometry (Attune NxT Flow Cytometer, Thermo Fisher Scientific, USA). First, an FSC/SSC gate was delineated in order to define a live gate analysis. Fluorescence intensity from samples were then compared by histogram analysis. The first comparison was among MPS I and normal fibroblasts (n=5). Then the three treated groups (48 h, 7 d and 30 d) were compared to MPS I untreated group (n=3). For each sample, 10,000 events were acquired.

### *Confocal microscopy*

After 30 min of incubation at 37 °C with CytoPainter LysoDeep Red Indicator, cells on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes, and mounted with Fluoroshield mounting medium with DAPI (Abcam, USA). Images were acquired in fluorescence (Ex/Em = 596/619 nm) and transmission channels with a 63x glycerin-immersion objective in a Leica Microsystems confocal microscope (Leica, Germany). Images were analyzed by ImageJ software (n=5) and the corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated with the formula:  $CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$ .

### *Next generation sequencing*

At two time points after transfection, 15 and 30 days, treated fibroblasts and MPS I untreated fibroblasts were collected, centrifuged and submitted to gDNA extraction using EasyDNA kit, according to the manufacturer's recommendations. The gDNA from transfected groups was treated with Exonuclease I (New England Biotechnologies, USA) according to the manufacturer's instructions to remove single stranded DNA. All gDNA samples were then quantified by a Qubit® Fluorometer using a Qubit® dsDNA HS Assay kit.

Libraries were amplified using Ion AmpliSeq™ Library kit 2.0 (according to the manufacturer's recommendations, starting from 10 ng of gDNA per pool using a customized AmpliSeq panel, composed by 2 primer pools. This panel includes 138

amplicons covering all coding regions of 6 genes (*IDS*, *IDUA*, *ARSB*, *GUSB*, *SUMF1* and *HYALI*). After cycling, the samples were ligated with adapters using Ion Xpress™ Barcode Adapters kit. Unamplified libraries were purified with Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter, USA) and the final product of library preparation was quantified using Qubit® dsDNA HS Assay kit in the Qubit® Fluorometer 2.0. All barcoded libraries were pooled in equimolar concentration (100 pM) and subsequently amplified through emulsion PCR using the Ion PGM Hi-Q Template kit in the OneTouch2™ Instrument. The percentage of positive Ion Sphere Particles (ISPs) was verified by Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer. Next, positive ISPs were enriched by the OneTouch™ ES Instrument. Finally, enriched ISPs were loaded onto an Ion 316 chip v2 and sequenced using the Ion PGM Hi-Q Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) on the Ion Torrent Personal Genome Machine, according manufacturer's instructions. All reagents and instruments were purchased from Thermo Fisher Scientific (USA), except if otherwise indicated.

The sequencing raw data was processed by Torrent Suite Software Suite v5.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) and coverage analysis and variant caller (VC) v.5.0 plugins were used. Processed reads were aligned to the hg19 reference genome. All identified variants were visually confirmed by the Integrative Genomics viewer (IGV), as well as the depth of coverage.

### *Data analysis*

For statistical analysis, the GraphPad Prism software was used. Students' t test was used to compare Normal and MPS I group for flow cytometry. One-way ANOVA with Tukey as post-hoc was used to compare MPS I and transfected groups in flow cytometry results. For enzyme assay and confocal microscopy, Kruskal-Wallis test with Dunn as post hoc was used. Statistical differences among groups were considered when  $p < 0.05$ .

## Results

To analyze correction of a point mutation and restoration of IDUA function, a set of experiments were performed using MPS I fibroblasts homozygous for p.W402X. Cells were analyzed for different parameters at different time points, as described in Materials and Methods. Transfected fibroblasts, compared to MPS I untreated cells, showed increased IDUA activity 48 h and 7 days after transfection ( $p=0.01$ ), with values reaching almost 20% of the activity detected in normal fibroblasts. The group examined 30 days after transfection showed intermediate values between the untreated MPS I and treated cells analyzed at earlier time points (Figure 2A). To evaluate the capacity of corrected cells to release the enzyme to the extracellular environment, from which it can be taken up and contribute to lysosomal metabolism in deficient cells, the culture medium was also analyzed. However, there was no difference between the treated groups compared to untreated MPS I fibroblasts (Figure 2B).

The deficiency in enzyme activity in MPS I cells causes accumulation of the undegraded substrate in the lysosome, which typically increase in size and number. CytoTracker LysoDeep Red Indicator was used to compare differences in lysosomal number and size between the groups. First, normal fibroblasts were compared, by flow cytometry, to MPS I fibroblasts. As expected, MPS I cells showed a signal approximately 50% higher than detected in normal cells ( $p<0.001$ ) (Figure 3A). When the treated groups were compared to untreated MPS I cells, 48 h after transfection there was an average increase of approximately 12% of the lysosomal marker, but without statistical difference. At 7 days after transfection, the dye signal decreased by approximately 25% compared to MPS I group ( $p <0.05$ ), showing a tendency to recover the normal phenotype. The group analyzed 30 days after treatment showed the highest variability, with values ranging from 30 to 80% of MPS I untreated cells. On average, dye signal decreased by 50% compared to MPS I group, but without significant difference (Figure 3B).

To complement the results observed in lysosomal size and quantity by flow cytometry, fibroblasts from all groups were subjected to the same labeling protocol with CytoPainter LysoDeep Red Indicator, fixed and examined by confocal microscopy. The corrected integrated density of fluorescence was determined for each group and compared. The same pattern observed by flow cytometry analysis was observed, but

probably due to the great variability of individual cells, there was no statistical difference among groups when lysosomal size and number was analyzed with image J (Figure 4).

To accurately verify the correction efficiency of the transfected cells, next generation sequencing was performed on a group of untreated MPS I cells, and transfected cells at 15 and 30 days after treatment. For each of the samples on average 500 reads were obtained in the p.W402X mutation region. The sequencing reads were first aligned to the human hg19 reference genome to enable identification of single-nucleotide variants (SNVs). The germ-line variant p.W402X was readily detectable and present in 100% of the alleles from the untreated MPS I cells, indicating that the sensitivity of variant detection in the analysis is high. The analysis of transfected samples revealed a correction (1293 TAG → TGG) of 7% and 4% at 15 and 30 days, respectively. Importantly, the alleles that showed the correction of this base also showed the silent mutation inserted at the PAM site (Figure 5). This silent mutation was included so that the oligonucleotide was not cleaved by Cas9. This confirms the occurrence of homologous directed recombination in these cells as a correction mechanism and estimates the frequency of correction.

## Discussion

Editing of the human genome to correct disease-causing mutations is a promising approach for the treatment of genetic disorders. Genome editing with CRISPR-Cas9 allows *in situ* correction of a mutant gene, thus restoring normal gene function under the control of endogenous regulatory elements. It is a further new area with few published studies on genetic diseases (Wu et al., 2013; Xie et al., 2014), none in Mucopolysaccharidosis or even in any lysosomal storage disorder. For treating MPS I, correction of a few cells could lead to the enzyme being secreted into the circulation and taken up by their neighboring cells, resulting in widespread correction of the biochemical defects (Carvalho et al., 2015). It has been reported, in fact, that the presence of less than 1% of normal IDUA activity in patients will moderate the severe clinical symptoms related to Hurler syndrome (Di Natale et al., 2002). This makes this disease an ideal candidate to benefit from genome editing technology. In this report we

demonstrate that it is possible to target a common MPS I mutation, correct *IDUA* gene by homology directed repair and partially restore enzyme activity and lysosomal function using the CRISPR-Cas9 system.

*IDUA* activity, undetectable in MPS I p.W402X/p.W402X fibroblasts reached up to 20% of the activity detected in normal cells 48 hours after transfection, and remained detectable in some transfected wells for up to 30 days after transfection. However, we observed a great variability among the transfection experiments. It is important to highlight that the groups analyzed at each time point derive from different transfection experiments, which may increase variability. However, due to the high mortality observed after transfection, it was impossible to perform all the experiments with the same cell pool – as it would be desirable. So, although the same protocols and parameters were used, a number of sets of experiments could show results better than others. Some possible causes for this are the stability of the vectors within cells, the efficiency of cleavage and recombination, or more likely, the transfection efficiency. As we are correcting a point mutation directly by cleavage and directed recombination, we have no way of selecting the modified cells, which highlight the importance of a highly efficient transfection method, so that the greatest number of cells can be modified.

To verify treatment efficiency by indirectly analyzing the lysosomes in the controls and treated groups, we used CytoPainter LysoDeep Red Indicator. This probes label acidic spherical granules within cells, so it is useful for labeling lysosomes. However, the mildly acidic interiors of late endosomes and autophagosomes also allows the dye to label these organelles to varying degrees. Indeed they have been used to investigate the degree of autophagy occurring by the measurement of their fluorescence by microscopy and to a limited extent by flow cytometry (Chikte et al., 2014; Warnes, 2015).

In this work, we first analyzed normal and MPS I fibroblasts by flow cytometry after incubation with the dye. In fact, we observed a clear difference in lysosomal dye signal among normal and MPS I untreated cells. Due to the sequential nature of the degradative process, cells deficient in lysosomal hydrolytic enzymes accumulate excessive levels of undegraded macromolecules and contain numerous endo/autolysosomes. When high levels of macromolecules accumulate in endo/autolysosomes, they inhibit catabolic enzymes and permeases that are not

genetically deficient, which results in secondary substrate accumulation (Platt et al., 2012). To verify if the correct cells were able to reverse this phenotype, cells from the three groups were incubated with LysoDeep, submitted to flow cytometry and compared to untreated MPS I cells. Interestingly, at 48 h, time in which the IDUA activity was higher, the signal detected was not different from the MPS I untreated cells. The absolute number was even higher. This is probably due to the short time the cells had to recover and to the autophagy induced by Lipofectamine (Lonez et al., 2012; Mo et al., 2012). In the group analyzed seven days after transfection it was possible to detect a decrease in signal intensity, indicating that the enzyme produced by corrected cells was being able to restore, at least partially, the lysosomal size and number to normal values.

The corrected integrated density of fluorescence obtained from confocal microscopy images after labeling of all treated groups and MPS I control did not show statistical difference. This is probably because the difference in fluorescence between groups is not high enough to be compared by this technique. In addition, a great variability between individual cells was observed and this can be a reason for the absence of statistical difference. Next generation sequencing demonstrated that even 30 days after transfection, there was still a percentage of corrected cells, showing stable correction mediated by this system.

Taken together the results from this work show that at 30 days the groups tend to be more variable and have lower enzyme activity than in the first days after transfection. Moreover, the cell pool that was sequenced had IDUA activity almost undetectable. This leads us to infer that in the first days after transfection, the correction efficiency is probably higher than the 7% or 4% detected at 15 and 30 days, respectively. If the corrected cells are not keeping their proportion over time, one reason may be caused by cell death induced by Lipofectamine in the first days after transfection (Fischer-Kierzkowska et al., 2011). Another reason may be the occurrence of off target cleavage. Important genome regions may have been cleaved by Cas9 and contribute to the lack of maintenance of these cells. Elucidating the frequency and underlying causes of off-target nuclease activity induced by CRISPR-Cas9, and applying strategies to reduce these effects will be of utmost importance for safe genome modification.



## Conclusion

Studies showing that CRISPR-Cas9 can mediate gene correction efficiently through the introduction of site-specific DSBs, and can induce HDR in cultured cells, have provided important proof-of-concept results for a future clinical application of engineered nucleases for genetic diseases. In this work we applied this strategy to correct a point mutation responsible for a Hurler phenotype in MPS I. We transfected fibroblasts and found these modified cells to produce IDUA and restore lysosomal mass. In addition, even at 30 days after transfection, we could still find a percentage of corrected cells evidenced by next generation sequencing, and that these cells still presented a phenotype that resembles of a normal fibroblast, with decreased number and size of lysosomes. Clinical translation of these results will require optimization of correction efficiency, correction of other cell types and a thorough analysis of off-target effects in the human genome, an issue that we have begun to monitor.

**Acknowledgments:** The authors thank to FIPE/HCPA and CNPq for financial support.

## References

- AtçEken, N., özgül, R.K., YüCel Yilmaz, D., Tokatli, A., CoşKun, T., Sivri, H.S., Dursun, A., and Karaca, M. (2016). Evaluation and identification of IDUA gene mutations in Turkish patients with mucopolysaccharidosis type I. *Turk. J. Med. Sci.* *46*, 404–408.
- Campos, D., and Monaga, M. (2012). Mucopolysaccharidosis type I: current knowledge on its pathophysiological mechanisms. *Metab. Brain Dis.* *27*, 121–129.
- Carvalho, T.G. de, Matte, U. da S., Giugliani, R., and Baldo, G. (2015). Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases. *Curr. Stem Cell Rep.* *1*, 9–15.
- Chikte, S., Panchal, N., and Warnes, G. (2014). Use of LysoTracker dyes: A flow cytometric study of autophagy. *Cytometry A* *85*, 169–178.
- Di Natale, P., Di Domenico, C., Villani, G.R.D., Lombardo, A., Follenzi, A., and Naldini, L. (2002). In vitro gene therapy of mucopolysaccharidosis type I by lentiviral vectors. *Eur. J. Biochem.* *269*, 2764–2771.

- Fischer-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarzab, M., Lisowska, K.M., and Krawczyk, Z. (2011). Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol. Biol.* *12*, 27.
- Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Di Tomaso, T., Firrito, C., Calabria, A., Moi, D., Mazzieri, R., Bonini, C., Holmes, M.C., et al. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* *510*, 235–240.
- Gupta, R.M., and Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* *124*, 4154–4161.
- Ledford, H. (2016). CRISPR: gene editing is just the beginning. *Nature* *531*, 156–159.
- Lonez, C., Vandenbranden, M., and Ruyschaert, J.-M. (2012). Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *64*, 1749–1758.
- Long, C., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* *345*, 1184–1188.
- Matte, U., Yogalingam, G., Brooks, D., Leistner, S., Schwartz, I., Lima, L., Norato, D.Y., Brum, J.M., Beesley, C., Winchester, B., et al. (2003). Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol. Genet. Metab.* *78*, 37–43.
- Mo, R.H., Zaro, J.L., Ou, J.-H.J., and Shen, W.-C. (2012). Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Mol. Biotechnol.* *51*, 1–8.
- Platt, F.M., Boland, B., and Spoel, A.C. van der (2012). Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* *199*, 723–734.
- Scott, H.S., Guo, X.H., Hopwood, J.J., and Morris, C.P. (1992). Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics* *13*, 1311–1313.
- Terlato, N.J., and Cox, G.F. (2003). Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet. Med.* *5*, 286–294.
- Warnes, G. (2015). Flow cytometric assays for the study of autophagy. *Methods San Diego Calif* *82*, 21–28.
- Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., Yan, Z., Li, D., and Li, J. (2013). Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* *13*, 659–662.
- Xie, F., Ye, L., Chang, J.C., Beyer, A.I., Wang, J., Muench, M.O., and Kan, Y.W. (2014). Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* *24*, 1526–1533.

## Figure legends

**Figure 1: Vectors.** A) A 20 bp target sequence adjacent to a NGG (PAM sequence, highlighted) which is distant 16 nucleotides of the mutated base on p.W402X (G→A, highlighted). B) Sequencing of a MPS I patient bearing the W402X mutation showing the target sequence (between red lines) inside the CRISPR-Cas9 vector. C) Sequence of the 143 bases, homologous to the p.W402X region, oligonucleotide for targeted recombination. Underlined is the target region, highlighted are first the corrected base and second the PAM base change.

**Figure 2: IDUA activity.** A) IDUA activity measured in fibroblasts MPS I p.W402X/p.W402X. Each dot represents an independent experiment, and results are expressed as percentage of the activity detected in normal fibroblasts. B) IDUA activity measured in culture media. \*p < 0.01, compared to untreated MPS I mice (Kruskal-Wallis tes, Dunn as post hoc).

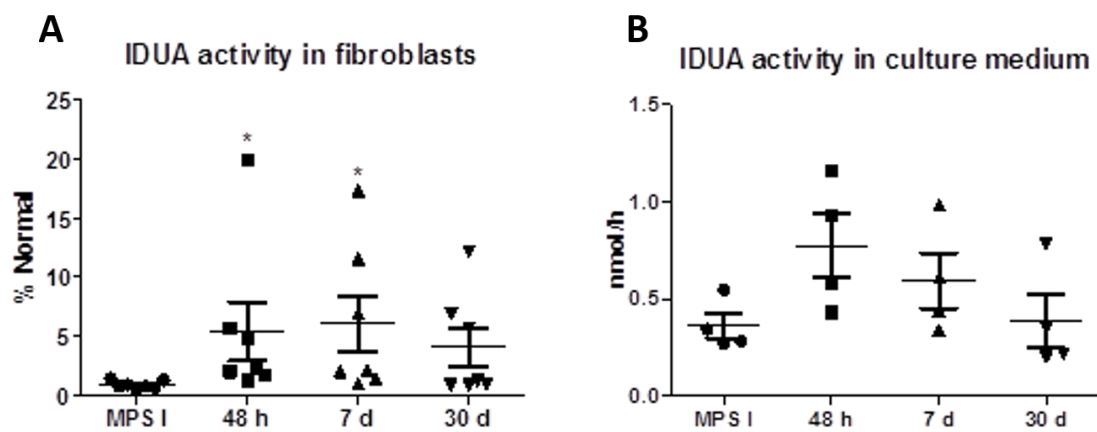
**Figure 3: Flow cytometry analysis of lysosomes.** After incubation with lysosome dye, live cells were analyzed for fluorescence intensity levels. Here we show representative histograms of three independent experiments. A) Comparison among MPS I and normal fibroblasts. B) The three treated groups were compared to MPS I untreated group.

**Figure 4: Confocal microscopy.** After incubation with lysosome dye CytoPainter LysoDeep Red Indicator (red), cells were fixed and mounted with Fluoroshield mounting medium with DAPI (blue). A) Images were acquired in fluorescence (Ex/Em = 596/619 nm) and transmission channels with a 63x glycerin-immersion objective in a Leica Microsystems confocal microscope. B) Images were analyzed by ImageJ software and the corrected total cell fluorescence (CTCF) was calculated with the formula: CTCF = Integrated Density – (Area of selected cell X Mean fluorescence of background readings).

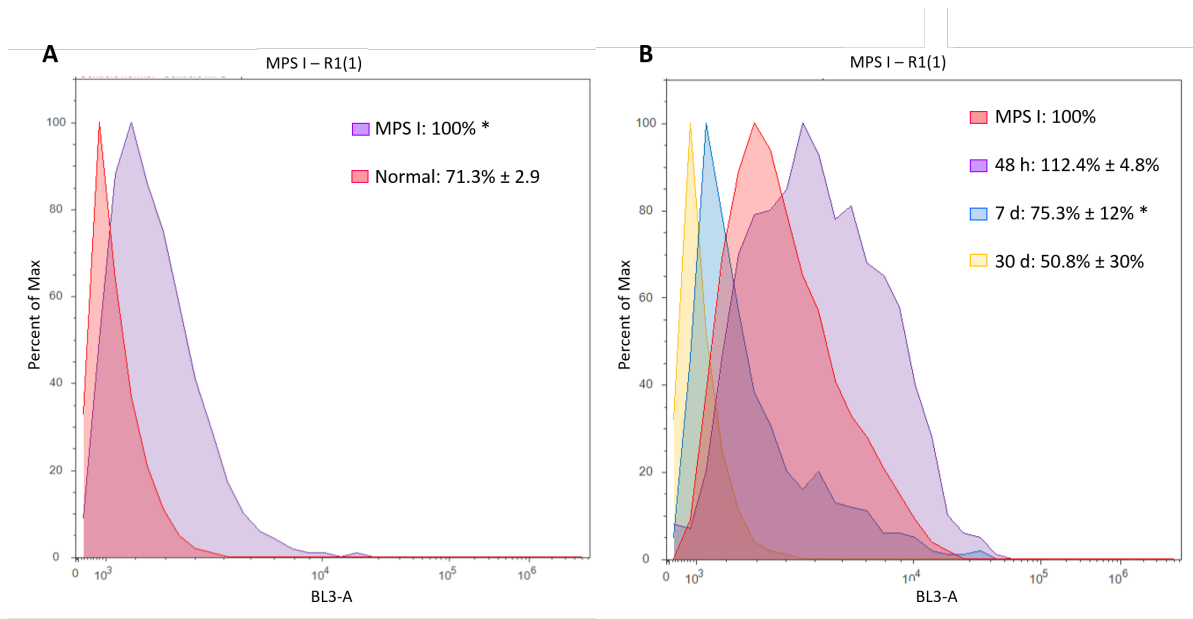
**Figure 5:** A screenshot of the Integrative Genomics Viewer (IGV) user interface at the IDUA exon 9 view. Three groups are represented: MPS I untreated, 15 days after transfection and 30 days after transfection. The highlighted base in the middle of the figure is the p.W402X mutation. Sixteen bases downstream there is a G→A in some reads of the treated groups, indicating the silent mutation added to the oligonucleotide. The three boxes in the middle of the image shows the number of reads for each sample and the percentage of the base that was read in that position.



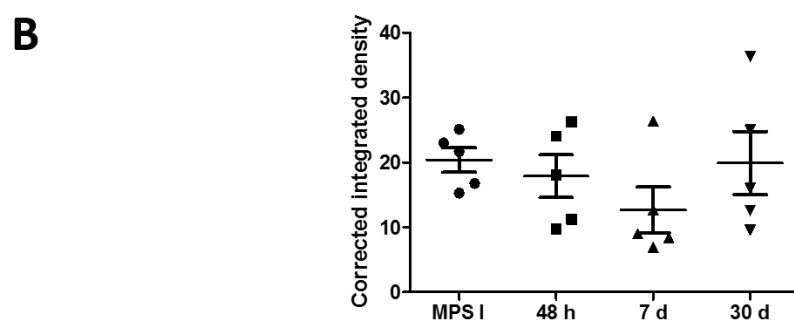
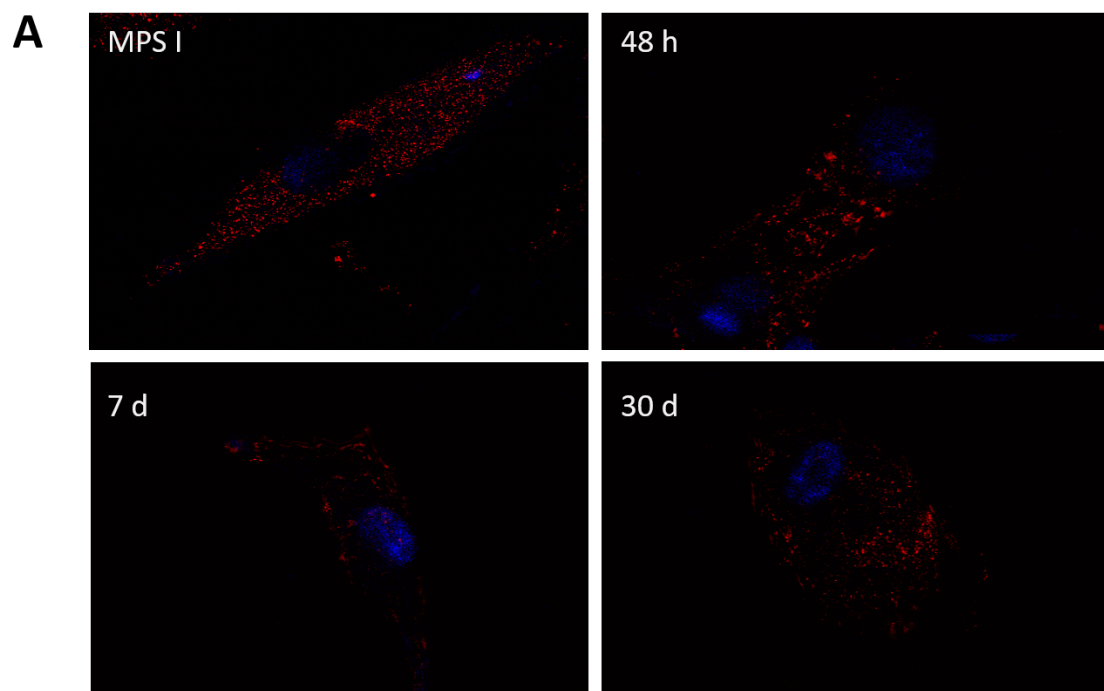
Figure 2



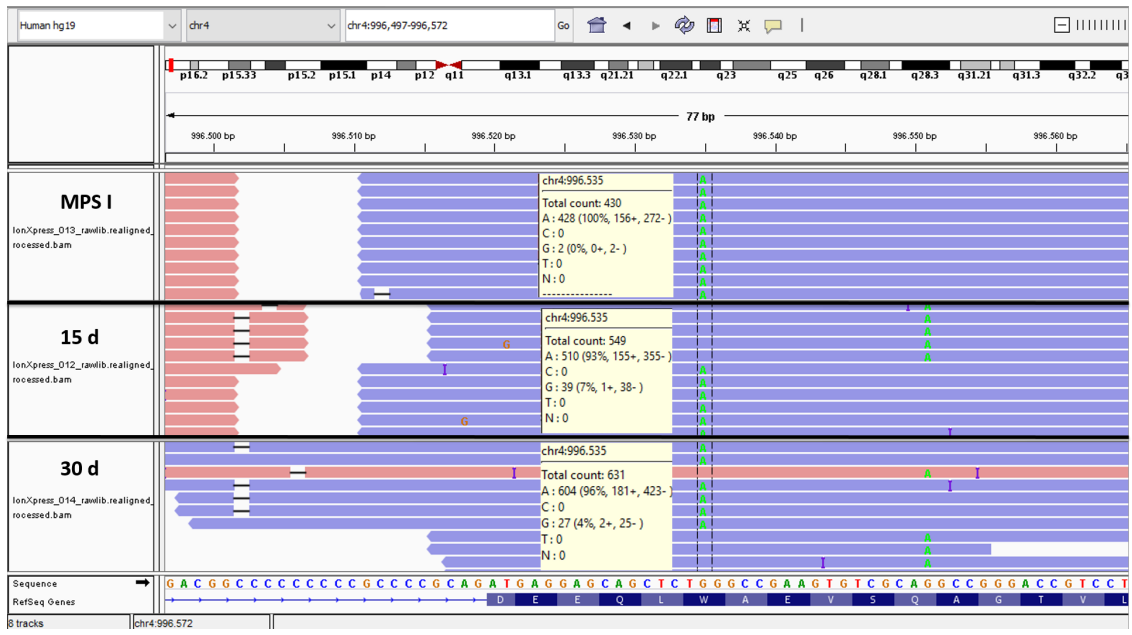
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**





#### 4.4. Resultados adicionais: Experimentos em animais

No último ano do doutorado iniciamos uma linha do projeto de edição gênica via CRISPR-Cas9 para o tratamento de MPS I que ainda não foi concluída, mas possui resultados parciais. Nesta etapa do trabalho pretendemos utilizar o sistema CRISPR-Cas9 para modificar células tronco mesenquimais (CTM) extraídas de camundongos MPS I de forma que elas passem a expressar *IDUA* e sejam então utilizadas em camundongos afetados pela doença. Neste caso, a abordagem é diferente da utilizada em fibroblastos de pacientes. Pretendemos inserir uma sequência contendo o cDNA da *IDUA* completo e mais um gene de resistência a antibiótico nas células para que elas possam ser selecionadas em cultura antes da injeção nos animais.

As CTM possuem diversas propriedades que as tornam ideais não só para terapia celular e medicina regenerativa, mas também como veículos para a entrega de genes em uma ampla variedade de situações clínicas. Entre estas propriedades estão a distribuição por todo o corpo e a facilidade de isolamento e expansão em cultura sem perda de potencial de diferenciação; a capacidade de se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares *in vitro* e *in vivo*; os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores que exercem; e a capacidade de migração para tecidos danificados, tumores sólidos e metástases após administração *in vivo* (Wei et al., 2013). Diferente das células tronco hematopoiéticas, que são difíceis de modificar geneticamente preservando seu potencial *in vivo*, as CTM podem ser modificadas e produzir eficientemente uma grande variedade de proteínas citoplasmáticas, ligadas à membrana, ou secretadas (Meirelles et al., 2009). Juntas estas propriedades tornam as CTM uma das populações de células tronco mais promissoras para uso em estudos de terapia gênica e ensaios clínicos. As técnicas de edição gênica baseadas em nucleases têm facilitado ainda mais a manipulação do genoma das CTM e permitido assim que elas sejam cada vez mais consideradas para o tratamento de doenças.

Os materiais e métodos utilizados e os resultados, ainda parciais, obtidos encontram-se descritos a seguir.

### *Modelo animal de MPS I*

Utilizamos como modelo animal camundongos nocaute para o gene da *Idua*, gentilmente cedidos pela Professora Elizabeth Neufeld (UCLA, Los Angeles, EUA) e pela Professora Nance Nardi (ULBRA). Este modelo foi descrito por Ohmi e colaboradores (2003) e foi criado por meio da interrupção do éxon 6 do gene da *Idua*. No meio do éxon foi inserido um gene de resistência à neomicina em sentido inverso. Como resultado foram produzidos camundongos com uma doença que mimetiza a Síndrome de Hurler, fenótipo mais grave da MPS I, com aumento do nível de GAGs na urina e em diversos tecidos e atividade indetectável de *Idua*.

Todos os procedimentos com animais estão sendo realizados na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e seguem as normas de adequação às diretrizes vigentes previstas na Lei 11.794/08 e nas resoluções normativas números 12 (Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) e 13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA). Os animais são mantidos em ambiente controlado (temperatura 20-24 °C, umidade relativa do ar 40-60%, sistemas de exaustão de ar) com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e alimentação comercial padrão para a espécie e água *ad libitum*. Todos os animais utilizados foram genotipados por identificação molecular do transgene, através da amplificação da região inserida utilizando os primers 5'-GAG ACT TGG AAT GAA CCA GAC-3' e 5'-ATA GGG GTA TCC TTG AAC TC-3' (Baldo et al., 2012b).

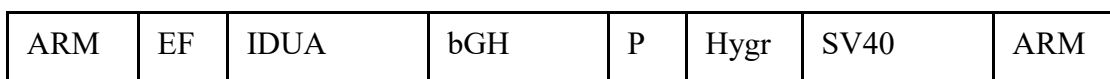
### *Extração de CTM*

Para obtenção das CTM, camundongos MPS I foram mortos por sobredose anestésica, as patas traseiras foram retiradas e as tíbias e fêmures foram separados e tiveram suas epífises cortadas, para que a medula óssea total fosse recuperada. As células foram então plaqueadas e as CTM foram obtidas após seleção por aderência em cultura (Meirelles et al., 2009). As células foram mantidas em cultura em meio DMEM com 20% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina sob condições padrão, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

## Vetores

O sistema PrecisionXTM CRISPR/Cas9 SmartNuclease (System Biology) foi utilizado para os experimentos de edição genômica. Neste sistema, a nuclease Cas9 e o RNA guia formado por um transcrito crRNA-tracrRNA estão presentes em um único vetor. Uma sequência alvo, 5'ggattctcccaggcccaggg 3', para clivagem pela Cas9 foi selecionada no locus ROSA26 do genoma de camundongos e foi inserida no vetor. O vetor completo foi inserido por transformação por choque térmico em bactérias competentes, cujas colônias foram então expandidas e submetidas a extração de plasmídeo com o kit Maxiprep (Life Technologies, EUA). O DNA plasmídeo extraído foi então sequenciado para verificação da correta orientação do inserto.

Para a recombinação direcionada foi utilizado um vetor contendo o cDNA de *Idua* que foi customizado pela empresa System Biology. O construto contém a sequência de cDNA da *Idua* regulada por um promotor e duas regiões homólogas (de aproximadamente 1 kb cada uma) ao locus ROSA26 de camundongos, na região que a Cas9 reconhece e cliva. Além disso, o vetor contém um gene de resistência à higromicina que é usado para selecionar as células em que a recombinação homóloga ocorreu (Figura 1).



**Figura 1:** Desenho esquemático do vetor doador utilizado para recombinação homóloga. ARM 1 e ARM 2: Regiões de 1 kb homólogas ao ROSA26. EF1 e P: Promotores. bGH e SV40: caudas poli A.

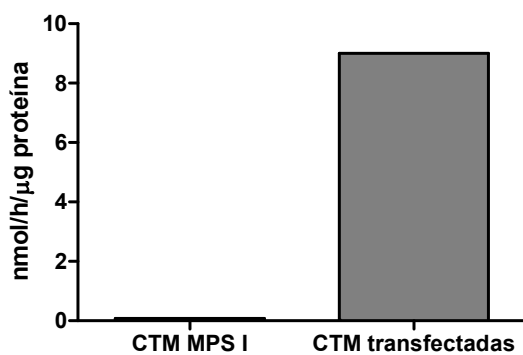
## Transfecção das CTM

CTM em passagens 2-3 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células em cada poço de uma placa de 6 poços) e cultivadas por 24 horas. As células foram transfectadas com os dois vetores, CRISPR-Cas9 e vetor doador, por meio de lipofecção, com o protocolo padronizado no primeiro artigo experimental desta tese.

### Confirmação da edição gênica das CTM

Para verificar se a Idua estava sendo corretamente produzida nas CTM editadas, foi realizado ensaio de atividade de Idua por método fluorimétrico utilizando o substrato artificial 4-metil-umbeliferil-alfa-L-iduronídeo (Wang et al., 2009). Os resultados foram corrigidos por quantidade de proteína, quantificadas pelo método de Lowry.

As primeiras células transfectadas apresentaram atividade de Idua aproximadamente 8 vezes maior que as células não transfectadas (Figura 2). Estas células não foram selecionadas e foram injetadas em dois camundongos neonatos. Foram injetadas  $1 \times 10^5$  células em 100  $\mu$ L de PBS pela veia temporal superficial.



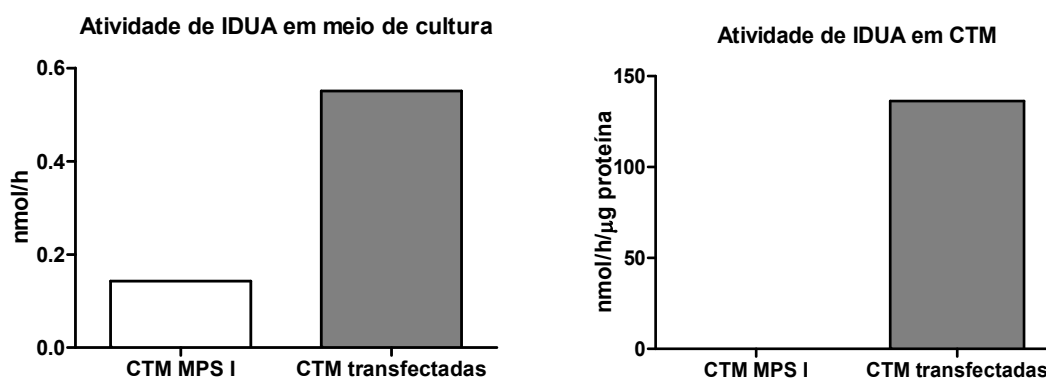
**Figura 2:** Atividade de Idua em um *pool* de CTM transfectadas e células MPS I não transfectadas.

Estes camundongos foram mantidos vivos por 6 meses. Ao final do primeiro mês, o nível sérico de Idua foi avaliado, e em um dos animais chegou a 1% da atividade detectada em soro de animais normais. Após eutanásia dos animais tratados, a atividade enzimática em amostras de fígado, baço e coração também foi quantificada, e um dos animais, em amostras de baço e fígado, apresentou resultados que parecem ser superiores aos animais não tratados (Tabela 1). Por se tratarem de dados preliminares, não foi realizada análise estatística.

**Tabela 1:** Atividade de Idua em camundongos de 6 meses.

	Animais não tratados	Animal tratado 1	Animal tratado 2	Animal Normal
Baço	0,06 ± 0,03	0,12	0,07	9,91 ± 1,31
Fígado	0,07 ± 0,01	0,13	0,1	11,14 ± 1,19
Coração	0,07 ± 0,02	0,06	0,04	7,76 ± 0,65

Como a atividade de Idua nas células injetadas foi muito baixa, no experimento de transfecção seguinte as células foram selecionadas com higromicina (80 µg/mL). As CTM selecionadas foram então expandidas em cultura, e o *pool* de células foi submetido à avaliação da atividade enzimática, assim como o meio de cultura em que elas estavam sendo cultivadas. A atividade enzimática nestas células chegou próximo a 150 nmol/h/µg proteína, e foi detectável inclusive no meio de cultura (Figura 3).



**Figura 3:** Atividade de Idua em meio de cultura e em CTM transfectadas e selecionadas.

Para confirmação da inserção do cDNA da *Idua* no locus ROSA26 do genoma das CTM, foi desenvolvido uma PCR com primers que amplificam uma região de 1117 bases. O primer *forward* se anela a uma sequência do ROSA26 anterior ao braço homólogo presente no vetor doador, e o *reverse* a uma sequência do interior do vetor, que não está naturalmente presente no genoma do camundongo. A PCR e sequenciamento encontram-se em processo de padronização e serão fundamentais para comprovar o genótipo das células injetadas nos próximos camundongos.

## Referências

Baldo, G., Mayer, F.Q., Martinelli, B., Meyer, F.S., Burin, M., Meurer, L., Tavares, A.M.V., Giugliani, R., and Matte, U. (2012). Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. *Cytotherapy* *14*, 860–867.

Meirelles, L. da S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 419–427.

Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., and Neufeld, E.F. (2003). Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 1902–1907.

Wang, D., Zhang, W., Kalfa, T.A., Grabowski, G., Davies, S., Malik, P., and Pan, D. (2009). Reprogramming erythroid cells for lysosomal enzyme production leads to visceral and CNS cross-correction in mice with Hurler syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 19958–19963.

Wei, X., Yang, X., Han, Z., Qu, F., Shao, L., and Shi, Y. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* *34*, 747–754.

## 5. DISCUSSÃO

O conhecimento das bases genéticas das doenças hereditárias conduziu ao conceito inicial de terapia gênica, em que um DNA exógeno “correto” pode ser usado para substituir o DNA com defeito naqueles que sofrem doenças genéticas. Entretanto, vários anos de pesquisa têm mostrado que esta proposta de terapia gênica é muito mais desafiadora e tecnicamente complexa do que parecia inicialmente. Um dos principais problemas enfrentados é a limitação na capacidade de controlar com precisão o material genético introduzido nas células. No entanto, as tecnologias de terapia gênica fizeram progressos notáveis durante esse tempo e mostram, cada vez mais, resultados clínicos promissores (Ginn et al., 2013; Naldini, 2015). Um marco importante deste progresso se deu com o surgimento das técnicas de edição gênica, que permitem realizar alterações precisas em sequências de DNA de forma mais segura e eficaz do que as técnicas até então utilizadas. O sistema CRISPR-Cas9, derivado de bactérias e que utiliza mecanismos de reparo naturais das células (Sander and Joung, 2014b), começou a ser usado em engenharia genética em 2013 (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013), é uma das ferramentas de edição gênica com maior destaque nesses últimos 3 anos, e é o sistema alvo deste trabalho. Nosso objetivo geral foi utilizar o sistema CRISPR-Cas9 para a correção gênica em um modelo de doença genética monogênica, a MPS I.

Apesar da promessa de correção gênica de maneira simples, precisa, segura e eficaz que vem acompanhada dos sistemas para edição gênica, sabemos que na prática os problemas surgem e se tornam limitações importantes para que os bons resultados apareçam. Um destes problemas é a entrega intracelular dos vetores. Existem diversas técnicas de transfecção celular, todas elas com limitações importantes, seja devido à baixa eficiência de transfecção, à citotoxicidade induzida ou à segurança do método (Cotrim and Baum, 2008; Fiszer-Kierzkowska et al., 2011). A que parece ser a mais segura e com maior eficiência, depende de um equipamento de alto custo e de kits específicos para cada tipo celular que ainda não estão disponíveis para grande parte dos laboratórios de pesquisa do mundo (Zeitelhofer et al., 2007). Portanto, o primeiro artigo experimental desta tese teve como objetivo padronizar um protocolo para transfecção de CTM utilizando Lipofectamina, um lipídeo catiônico amplamente utilizado em

transfecções celulares. O tipo celular foi escolhido devido à sua facilidade de obtenção e ampla utilização em tratamentos de doenças genéticas.

No primeiro trabalho experimental da tese conseguimos estabelecer um método de transfecção simples e seguro utilizando Lipofectamina 3000<sup>®</sup> (Life Technologies) e com eficiência de até 26% de células transfectadas expressando a proteína GFP presente no vetor utilizado 48 horas após a transfecção. Estabelecemos uma relação DNA/lipídeo ideal, e ressaltamos a importância de a concentração celular inicial ser baixa, provavelmente porque a lipofecção depende de divisão celular. Em células em divisão, o DNA exógeno pode chegar ao núcleo ao ser retido na membrana nuclear durante seu reestabelecimento após a mitose (Gresch et al., 2004). A utilização de células com poucas passagens também mostrou ser um fator importante. Sabemos que para cada tipo celular as condições de transfecção ótimas serão diferentes, e por isso é tão importante a padronização para cada uma delas. As CTM são células de difícil transfecção, portanto o protocolo padronizado mostrou resultados satisfatórios para o tipo celular e o método utilizado.

Uma vez que a linha de pesquisa principal do nosso grupo é a investigação de fisiopatologia e de alternativas para o tratamento de MPS I, idealizamos o segundo trabalho experimental desta tese. Ele teve como objetivo corrigir uma mutação de ponto causadora de um fenótipo grave em fibroblastos de um paciente com MPS I. Para isso o sistema CRISPR-Cas9 de edição gênica foi utilizado. Ainda existem poucos trabalhos publicados utilizando ferramentas de edição gênica para o tratamento de doenças lisossômicas, nenhum para correção de MPS I. Nosso trabalho é uma prova de conceito de que a técnica funciona para esta doença e que pode no futuro ser utilizada para corrigir mutações de ponto, que são a maioria das mutações causadoras da doença (<http://www.hgmd.org>).

Entretanto, entre outros fatores, devido à técnica utilizada ser uma área de trabalho nova não só no nosso grupo de pesquisa, mas também no mundo, enfrentamos diversos problemas de padronização, incluindo a elaboração dos vetores. Além disso, a importação do vetor levou mais tempo do que o estimado inicialmente e nem todas as etapas previstas para a realização desse trabalho puderam ser cumpridas. Portanto, ainda existem muitas etapas a serem realizadas nesta área para que os resultados se aproximem mais de uma aplicação clínica. Nesta primeira etapa, utilizamos células de



um paciente homozigoto para a mutação p.W402X devido a esta ser uma mutação de alta incidência mundial, inclusive na população brasileira, e ser causadora de um fenótipo grave, em que a atividade de IDUA é indetectável (AtçEken et al., 2016). Isso facilita a visualização de resultados, já que qualquer alteração na atividade enzimática é facilmente detectada. Pretendemos realizar os mesmos experimentos em células de outros pacientes com esta e outras mutações. Já o fizemos em células de outro paciente com a mesma mutação (p.W402X/p.W402X) e quantificamos a atividade de IDUA nos fibroblastos em 48 horas. Os resultados foram bastante semelhantes aos descritos no artigo, com poços de células transfectadas chegando perto de 20% da atividade normal e outros com atividade quase inalterada (Figura 1).

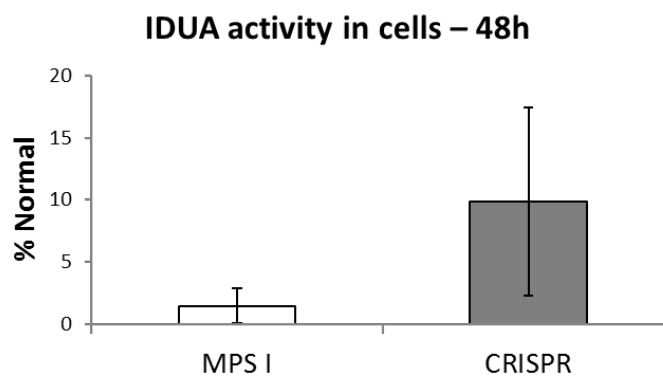


Figura 6: Atividade de IDUA. Células MPS I p.W402X/p.W402X não tratadas e em 48 horas após transfecção.

A grande variabilidade nos experimentos de transfecção é um fator que deve ser investigado, especialmente em casos como o nosso de correção de alterações pequenas, já que não há como selecionar apenas as células modificadas. Provavelmente uma técnica com maior eficiência de transfecção diminua estas diferenças. Além disso, a eficiência de correção por recombinação direcionada pode ser influenciada por diversos fatores. Em primeiro lugar, a natureza da modificação do genoma pode influenciar as taxas de edição. Grandes inserções mediadas por HDR ocorrem menos que HDR para pequenas alterações (Byrne et al., 2014). Em segundo lugar, as alterações feitas em sequências que não modificam suficientemente o local de reconhecimento e clivagem da Cas9 pode resultar em mutagênese adicional por NHEJ na mesma região, reduzindo

potencialmente as taxas terapêuticas da edição. O tamanho da região homóloga também pode ter influência, e quanto maior for esta região, maiores as chances de ocorrência de recombinação. Ainda, vetores doadores com fita simples também parecem ter mais sucesso de recombinação do que vetores com fita dupla de DNA (Cox et al., 2015). Além disso, suprimir vias de reparo celular por NHEJ também pode aumentar as taxas de correção por HDR, embora a segurança desta estratégia não seja conhecida e deve ser cuidadosamente avaliada antes da aplicação num contexto terapêutico (Byrne et al., 2014).

Em nossos experimentos, especialmente aos 30 dias após a transfecção, a variabilidade parece ser maior. É possível que esteja havendo uma diferença na eficiência da divisão de células que tiveram a mutação corrigida em relação às demais. Há relatos de células modificadas que têm uma vantagem seletiva, o que reduz o número de células modificadas inicialmente necessárias para reverter os sintomas da doença. Isso acontece na imunodeficiência severa combinada (SCID-X1) causada por mutações no gene da IL2RG, a função do qual é necessária para o desenvolvimento adequado de células da linhagem linfocítica. Células com IL2RG ativo têm maior capacidade de expansão relativa às células mutadas e são capazes de causar um aumento progressivo do efeito terapêutico (Cox et al., 2015). Apesar de vantagens seletivas em células corrigidas já terem sido relatadas para MPS I em estudos de terapia gênica (Di Natale et al., 2002), nossos achados apontam em direção contrária.

Um fator importante a ser analisado e que pode estar relacionado a um possível prejuízo na capacidade de divisão celular é a ocorrência de clivagens fora do local de interesse (*off-target*). Principalmente em estudos de edição gênica que chegam a uma aplicação clínica, é importante que se faça uma análise dos possíveis locais onde possam ocorrer clivagens *off-target*, para que não sejam modificadas indiretamente outras regiões importantes dentro do genoma (Fine et al., 2014). Não há ainda um consenso sobre a frequência de *off-targets* via CRISPR-Cas9 ser alta ou não. O que se sabe é que para que a nuclease consiga clivar a dupla fita de DNA, os 13 nucleotídeos mais próximos ao PAM (sequência core) não devem ter mais de dois *mismatches*, e na sequência inteira de 20 bases não devem existir mais de quatro. Existem ferramentas computacionais que fazem predição de possíveis sítios de clivagem *off-target* por meio do número e localização de *mismatches* entre a sequência do RNA guia e o genoma de referência. Analisamos a sequência que escolhemos para reconhecimento e clivagem

pela Cas9 quanto ao número de eventos *off-target* por meio de uma destas ferramentas online: <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>. Cada software tem seus métodos de pesquisa e os resultados podem apresentar pequenas diferenças. O software escolhido seleciona apenas regiões com homologia e que estão adjacentes a uma sequência PAM. Na tabela, o primeiro resultado é a nossa sequência alvo (Tabela 1). Ela apresenta um *mismatch*, que é a sequência mutada que queremos corrigir.

**Tabela 2** Possíveis eventos *off-target* preditos pelo site <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>

Coordenadas	Fita	MM	Sequência alvo	PAM	Local	Gene
chr4:996530-996552	+	1	GCTCTGGG[CCGAAGTGTCGC]	AGG	E	IDUA
chr10:46168004-46168026	-	4	GCGCAAGG[CCGGAGTGGCGC]	GGG	E	ZFAND4
chr19:8456438-8456460	-	4	CCACTAGG[CCTAAAGTGTAGC]	TGG	I	RAB11B-AS1

MM: Número de *mismatches*. E: éxon. I: íntron.

Na sequência utilizada em nossos experimentos, o número mínimo de *mismatches* que aparece em sequências com regiões homólogas é 4, com duas delas acontecendo na região que compreende os 13 nucleotídeos mais próximos da sequência PAM e as outras duas fora. Isso torna pouco provável que esteja acontecendo clivagem inespecífica em grandes frequências, já que o reconhecimento dessas sequências deve ser fraco. O próximo passo da análise deve ser selecionar as sequências com maior probabilidade de *off-target* e sequenciá-las para verificar a frequência de ocorrência de clivagens. Caso recombinações *off-target* estejam ocorrendo em locais importantes do genoma, algumas possíveis soluções são a diminuição da quantidade de vetor CRISPR-Cas9 utilizado na transfecção, a expressão da Cas9 sob um promotor mais fraco (o que provavelmente diminuiria também a atividade da nuclease na sequência alvo), ou o uso de nickases (Ran et al., 2013).

Em casos em que a especificidade é muito necessária, duas nickases Cas9 podem ser utilizadas para gerar a quebra da dupla fita em vez de uma única nuclease Cas9. Na

versão nickase da Cas9 o domínio de endonuclease foi mutado, de modo que apenas uma ruptura de DNA de fita simples é feita. Duas sequências alvos são selecionadas nas cadeias opostas no mesmo locus e são então combinadas para gerar uma quebra da fita dupla de DNA. Clivagens *off-target* da cadeia simples de DNA provavelmente não serão reparadas por NHEJ, já que a outra fita estará intacta e poderá servir como molde para o reparo. Como consequência, as taxas de inserções e deleções em locais inespecíficos são muito baixas (Byrne et al., 2014). Ran e colaboradores (2013) demonstraram que utilizar pares de nickases em vez da Cas9 comumente utilizada reduzia a frequência de *off-targets* em 50 – 1000 vezes em linhagens celulares, facilitando o nocaute de genes em zigotos de camundongos sem diminuir a eficiência de clivagem.

Outra análise importante que ainda deve ser feita para complementar os dados apresentados é o sequenciamento de nova geração em outros tempos de tratamento. Aos 15 e 30 dias após a transfecção, obtivemos uma quantidade de células corrigidas de menos de 10%. Esse número de células, apesar de parecer baixo, parece ser suficiente para corrigir defeitos celulares causados pela doença. Conforme já mencionado, existem relatos de que uma atividade de IDUA de 10% da detectada em pessoas normais é suficiente para produzir enzima para corrigir, em diferentes níveis, os defeitos nas células de um paciente MSP I (Baldo et al., 2014). Entretanto, o sequenciamento de outros tempos de tratamento nos dará respostas quanto à estabilidade das células corrigidas. Saber se em 48 horas o número de células corrigidas é maior, assim como a atividade enzimática, e se após os 30 dias elas permanecem viáveis é extremamente importante para o aperfeiçoamento e futura aplicação clínica da técnica.

Para termos uma ideia do efeito da correção obtida sobre o fenótipo das células, avaliamos, além da atividade enzimática, o número e tamanho dos lisossomos. Utilizamos este parâmetro por ter se mostrado confiável para diferenciar células MPS I de células normais. Devido à natureza sequencial do processo de degradação, as células deficientes em enzimas lisossômicas acumulam macromoléculas não degradadas e contêm numerosos autolisossomos, que acabam inibindo a atividade de outras enzimas catabólicas envolvidas em rotas bioquímicas relacionadas. Isso acaba causando acúmulos secundários e ainda mais danos aos lisossomos (Platt et al., 2012). A citometria de fluxo após marcação com o reagente CytoPainter LysoDeep Red Indicator

(Abcam, EUA) ou outros fluoróforos com ação semelhante é utilizada em alguns estudos para avaliar autofagia (Chikte et al., 2014; Settembre et al., 2008; Warnes, 2015) e mostrou ser útil em nossa avaliação. As células corrigidas, ao se recuperarem do stress causado pelo protocolo de transfecção passaram a exibir resultados mais parecidos com as células normais.

Juntos os resultados deste trabalho são promissores quanto à utilização deste sistema para o tratamento da MPS I. Entretanto, utilizar fibroblastos para o tratamento de pacientes certamente não seria adequado. A dificuldade de obtenção de células tronco de pacientes faz com que ainda seja difícil testarmos a estratégia em células que possam ser utilizadas para tratamento. Portanto, ainda há um longo caminho de pesquisas a ser percorrido para que esta estratégia possa ser testada em células tronco de pacientes que sejam então corrigidas de forma precisa e segura e reimplantadas para obtenção de benefícios clínicos.

Um passo importante da pesquisa com edição gênica via CRISPR-Cas9 passa por experimentos em animais. Nosso grupo de pesquisa desenvolve há anos trabalhos com um modelo animal de MPS I nocaute para o gene da Idua, tanto em estudos de fisiopatologia da doença quanto em tratamentos experimentais. A abordagem utilizada para o tratamento destes camundongos com CRISPR-Cas9 é diferente da utilizada em células de pacientes. Os camundongos têm o gene da Idua interrompido por outro gene, portanto não podemos corrigi-lo da mesma forma que uma mutação de ponto. Em vez disso, optamos por inserir o cDNA da Idua inteiro e sob controle de um promotor inserido no mesmo vetor para que ele possa ser expresso. O vetor que deve ser inserido no genoma por recombinação neste caso é muito maior que o oligonucleotídeo utilizado nas células humanas, e conseqüentemente, a eficiência de transfecção tende a diminuir. Isso ressalta a importância de métodos de transfecção adequados. A vantagem neste caso é que um gene de resistência a um antibiótico pode ser acrescentado ao vetor para que possa ser feita seleção apenas das células modificadas.

Num primeiro experimento, injetamos células transfectadas, porém sem seleção em dois animais, que foram mantidos por seis meses. A atividade enzimática em amostras de dois dos órgãos analisados desses camundongos se mostrou um pouco mais alta que a detectada em camundongos MPS I, mas ainda muito baixa, conforme esperado. Os próximos experimentos são promissores, já que conseguimos selecionar

células expressando IDUA em níveis altos e estamos em fase de comprovar por sequenciamento a modificação destas células e injetá-las nos animais. Caso funcione, esta se torna uma alternativa com grandes chances de futuras aplicações clínicas, já que as CTM são de fácil obtenção, expansão e cultivo, e o método de transplante dessas células em humanos já está bem estabelecido.

Alguns estudos com edição gênica em animais modelos de doenças genéticas já foram publicados e mostraram bons resultados. Li e colaboradores (2011) injetaram ZFN e um vetor doador diretamente no fígado de animais modelo de Hemofilia B, deficientes em fator IX de coagulação, utilizando vetores virais. Eles relataram que o nível de correção foi de 2 a 3% do normal, o suficiente para corrigir os problemas de coagulação observados nesses animais. Wu e colaboradores (2013), no primeiro trabalho que utilizou CRISPR-Cas9 em doença genética *in vivo*, corrigiram zigotos de uma linhagem de camundongos com uma mutação do gene *Crygc* que causa catarata, e obtiveram camundongos sem a doença e capazes de transmitir o gene corrigido para as próximas gerações. Ao analisarem a frequência de mutações *off-target*, eles verificaram que os eventos foram raros. Yin e colaboradores (2014) utilizaram CRISPR-Cas9 para corrigir uma mutação de ponto que altera um sítio de splice e causa danos em hepatócitos de camundongos com tirosinemia. Após injeção hidrodinâmica, eles obtiveram correção em aproximadamente 1/250 células hepáticas, quantidade suficiente para corrigir alguns aspectos da doença. Ainda, eles relataram que as células corrigidas possuem vantagem seletiva em relação às outras.

Mais recentemente, Sharma e colaboradores (2015) publicaram um trabalho em que injetam ZFN e um vetor para recombinação diretamente no fígado de camundongos com hemofilia A e B com o auxílio de vetores adenovirais-associados. O sistema utilizado foi desenvolvido de modo que o gene seja inserido para ficar sob regulação do promotor da albumina, estratégia que permitiu a detecção da expressão prolongada e estável dos fatores de coagulação deficientes. Ao utilizar o mesmo sistema em camundongos normais, eles conseguiram fazer com que enzimas lisossômicas também fossem produzidas.

Ainda são poucos os estudos *in vivo* e há ainda muito a ser aperfeiçoado para que a edição gênica possa ser utilizada com segurança e eficácia para tratamento de doenças genéticas em humanos. Apesar de estar apenas no início, a tecnologia apresenta

oportunidades promissoras para combater uma série de doenças que estão além do alcance das terapias anteriores. As diversas possibilidades apresentadas têm de ser associadas sempre a um planejamento rigoroso. Entretanto, dado o ritmo acelerado dos avanços tecnológicos e a ampla gama de suas aplicações em ciências básicas e clínicas, o caminho à frente será sem dúvida cheio de sucessos.

## 6. CONCLUSÕES

A conclusão geral deste trabalho é que é possível utilizar edição gênica via CRISPR-Cas9 para correção gênica em um modelo de doença genética monogênica, a MPS I.

- Publicamos um artigo de revisão bibliográfica em que discutimos como a edição gênica pode ser combinada ao transplante de células tronco hematopoiéticas, entre outras alternativas, para ser utilizada como um tratamento para as DLD. Comentamos quais as doenças dentro deste grupo se beneficiariam mais e quais são os principais problemas a serem enfrentados para que essa abordagem possa ser finalmente utilizada.

- Um protocolo simples e eficiente para transfecção de células tronco mesenquimais humanas foi estabelecido, a com ele conseguimos atingir até 26% de células transfectadas.

- Fibroblastos de um paciente MPS homozigoto para p.W402X foi transfectado utilizando o sistema CRISPR-Cas9 e um vetor doador com a sequência correta.

- As células transfectadas foram avaliadas e foi detectada diferença entre a atividade de IDUA de células MPS I não tratadas e células transfectadas, estas chegando a até 20% do valor normal. O número e tamanho dos lisossomos diminuiu em relação às células MPS I não tratadas no grupo analisado 7 dias após a transfecção. O sequenciamento de nova geração comprovou que um percentual das células foi corretamente modificado.



## 7. REFERÊNCIAS

- Aronovich, E.L., Bell, J.B., Khan, S.A., Belur, L.R., Gunther, R., Koniar, B., Schachern, P.A., Parker, J.B., Carlson, C.S., Whitley, C.B., et al. (2009). Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1136–1144.
- AtçEken, N., özgül, R.K., YüCel Yilmaz, D., Tokatli, A., CoşKun, T., Sivri, H.S., Dursun, A., and Karaca, M. (2016). Evaluation and identification of IDUA gene mutations in Turkish patients with mucopolysaccharidosis type I. *Turk. J. Med. Sci.* *46*, 404–408.
- Baldo, G., Quoos Mayer, F., Burin, M., Carrillo-Farga, J., Matte, U., and Giugliani, R. (2012a). Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells. *Cells Tissues Organs* *195*, 323–329.
- Baldo, G., Mayer, F.Q., Martinelli, B., Meyer, F.S., Burin, M., Meurer, L., Tavares, A.M.V., Giugliani, R., and Matte, U. (2012b). Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. *Cytotherapy* *14*, 860–867.
- Baldo, G., Giugliani, R., and Matte, U. (2014). Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin. Drug Deliv.* *11*, 449–459.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* *315*, 1709–1712.
- Baxter, M.A., Wynn, R.F., Deakin, J.A., Bellantuono, I., Edington, K.G., Cooper, A., Besley, G.T.N., Church, H.J., Wraith, J.E., Carr, T.F., et al. (2002). Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood* *99*, 1857–1859.
- Byrne, S.M., Mali, P., and Church, G.M. (2014). GENOME EDITING IN HUMAN STEM CELLS. *Methods Enzymol.* *546*, 119–138.
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* *188*, 773–782.
- Chikte, S., Panchal, N., and Warnes, G. (2014). Use of LysoTracker dyes: A flow cytometric study of autophagy. *Cytometry A* *85*, 169–178.
- Clarke, L. a (2011). Pathogenesis of skeletal and connective tissue involvement in the mucopolysaccharidoses: glycosaminoglycan storage is merely the instigator. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *50 Suppl 5*, v13-8.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* *339*, 819–823.

- Cotrim, A.P., and Baum, B.J. (2008). Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol. Pathol.* *36*, 97–103.
- Cox, D.B.T., Platt, R.J., and Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* *21*, 121–131.
- D'Aco, K., Underhill, L., Rangachari, L., Arn, P., Cox, G.F., Giugliani, R., Okuyama, T., Wijburg, F., and Kaplan, P. (2012). Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *Eur. J. Pediatr.*
- Di Natale, P., Di Domenico, C., Villani, G.R.D., Lombardo, A., Follenzi, A., and Naldini, L. (2002). In vitro gene therapy of mucopolysaccharidosis type I by lentiviral vectors. *Eur. J. Biochem.* *269*, 2764–2771.
- Dickson, P.I., Hanson, S., Mcentee, M.F., Vite, C.H., Carole, A., Mlikotic, A., Chen, A.H., Ponder, K.P., Haskins, M.E., Tippin, L., et al. (2011). NIH Public Access. *Enzyme* *101*, 115–122.
- Dickson, P.I., Kaitila, I., Harmatz, P., Mlikotic, A., Chen, A.H., Victoroff, A., Passage, M.B., Madden, J., Le, S.Q., Naylor, D.E., et al. (2015). Safety of laronidase delivered into the spinal canal for treatment of cervical stenosis in mucopolysaccharidosis I. *Mol. Genet. Metab.* *116*, 69–74.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* *346*, 1258096.
- Esko, J.D., Kimata, K., and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
- Fischer-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarzab, M., Lisowska, K.M., and Krawczyk, Z. (2011). Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol. Biol.* *12*, 27.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* *27*, 59–65.
- Fraga, M., de Carvalho, T.G., Diel, D. da S., Kretzmann Filho, N.A., Teixeira, H.F., and Matte, U. (2015a). Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model. *J. Nanosci. Nanotechnol.* *15*, 810–816.
- Fraga, M., Bruxel, F., Diel, D., de Carvalho, T.G., Perez, C.A., Magalhães-Paniago, R., Malachias, Â., Oliveira, M.C., Matte, U., and Teixeira, H.F. (2015b). PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *209*, 37–46.

Fu, H., Cataldi, M.P., Ware, T.A., Zaraspe, K., Meadows, A.S., Murrey, D.A., and McCarty, D.M. (2016). Functional correction of neurological and somatic disorders at later stages of disease in MPS IIIA mice by systemic scAAV9-hSGSH gene delivery. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 16036.

Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Di Tomaso, T., Firrito, C., Calabria, A., Moi, D., Mazzieri, R., Bonini, C., Holmes, M.C., et al. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* 510, 235–240.

Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J. Gene Med.* 15, 65–77.

Giugliani, R. (2012). Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J. Inherit. Metab. Dis.*

Giugliani, R., Federhen, A., Rojas, M.V.M., Vieira, T., Artigalás, O., Pinto, L.L., Azevedo, A.C., Acosta, A., Bonfim, C., Lourenço, C.M., et al. (2010). Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet. Mol. Biol.* 33, 589–604.

Grau, J., Boch, J., and Posch, S. (2013). TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 2931–2932.

Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Körner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., et al. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods San Diego Calif* 33, 151–163.

Guan, Y., Ma, Y., Li, Q., Sun, Z., Ma, L., Wu, L., Wang, L., Zeng, L., Shao, Y., Chen, Y., et al. (2016). CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol. Med.* 8, 477–488.

Guilinger, J.P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Joung, J.K., and Liu, D.R. (2014). Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nat. Methods* 11, 429–435.

Gupta, R.M., and Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* 124, 4154–4161.

Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., et al. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118, 3132–3142.

Hinderer, C., Katz, N., Louboutin, J.-P., Bell, P., Yu, H., Nayal, M., Kozarsky, K.F., O'Brien, W.T., Goode, T., and Wilson, J.M. (2016). Delivery of an adeno-associated virus vector into CSF attenuates central nervous system disease in mucopolysaccharidosis type II mice. *Hum. Gene Ther.*

Hobbs, J.R., Hugh-Jones, K., Barrett, A.J., Byrom, N., Chambers, D., Henry, K., James, D.C., Lucas, C.F., Rogers, T.R., Benson, P.F., et al. (1981). Reversal of clinical features

of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet Lond. Engl.* 2, 709–712.

Hopwood, J.J., and Morris, C.P. (1990). The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol. Biol. Med.* 7, 381–404.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433.

Jackson, M., Roberts, A.D., Martin, E., Rout-Pitt, N., Gronthos, S., and Byers, S. (2015). Mucopolysaccharidosis enzyme production by bone marrow and dental pulp derived human mesenchymal stem cells. *Mol. Genet. Metab.* 114, 584–593.

Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gaastra, W., and Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.

Kay, M.A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* 12, 316–328.

Keeling, K.M., and Bedwell, D.M. (2002). Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 80, 367–376.

Kingma, S.D.K., Wagemans, T., IJlst, L., Wijburg, F.A., and van Vlies, N. (2014). Genistein increases glycosaminoglycan levels in mucopolysaccharidosis type I cell models. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 813–821.

Lagranha, V.L., de Carvalho, T.G., Giugliani, R., and Matte, U. (2013). Treatment of MPS I mice with microencapsulated cells overexpressing IDUA: effect of the prednisolone administration. *J. Microencapsul.* 30, 383–389.

Lehman, T.J. a, Miller, N., Norquist, B., Underhill, L., and Keutzer, J. (2011). Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 50 *Suppl* 5, v41-8.

Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S.Y., Bhagwat, A.S., Malani, N., Anguela, X.M., Sharma, R., Ivanciu, L., et al. (2011). In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475, 217–221.

Lin, J., and Musunuru, K. (2016). Genome Engineering Tools for Building Cellular Models of Disease. *FEBS J.*

Maegawa, G.H.B., Tropak, M., Buttner, J., Stockley, T., Kok, F., Clarke, J.T.R., and Mahuran, D.J. (2007). Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J. Biol. Chem.* 282, 9150–9161.

- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Martins, A.M., Dualibi, A.P., Norato, D., Takata, E.T., Santos, E.S., Valadares, E.R., Porta, G., de Luca, G., Moreira, G., Pimentel, H., et al. (2009). Guidelines for the management of mucopolysaccharidosis type I. *J. Pediatr.* 155, S32-46.
- Matte, U., Yogalingam, G., Brooks, D., Leistner, S., Schwartz, I., Lima, L., Norato, D.Y., Brum, J.M., Beesley, C., Winchester, B., et al. (2003). Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol. Genet. Metab.* 78, 37–43.
- Matte, U., Baldo, G., and Giugliani, R. (2011a). Non Viral Gene Transfer Approaches for Lysosomal Storage Disorders. In *Non-Viral Gene Therapy*, X. Yuan, ed. (InTech), p.
- Matte, U., Lagranha, V.L., de Carvalho, T.G., Mayer, F.Q., and Giugliani, R. (2011b). Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 983–990.
- Metcalf, J.A., Linders, B., Wu, S., Bigg, P., O'Donnell, P., Sleeper, M.M., Whyte, M.P., Haskins, M., and Ponder, K.P. (2010). Upregulation of Elastase Activity in Aorta in Mucopolysaccharidosis I and VII Dogs May be Due to Increased Cytokine Expression. *Mol. Genet. Metab.* 99, 396–407.
- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 353, aad5147.
- Moskot, M., Gabig-Cimińska, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Węsierska, M., Bocheńska, K., and Węgrzyn, G. (2016). Cell cycle is disturbed in mucopolysaccharidosis type II fibroblasts, and can be improved by genistein. *Gene* 585, 100–103.
- Muenzer, J., Wraith, J.E., and Clarke, L. a (2009). Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics* 123, 19–29.
- Munoz-Rojas, M.-V., Vieira, T., Costa, R., Fagondes, S., John, A., Jardim, L.B., Vedolin, L.M., Raymundo, M., Dickson, P.I., Kakkis, E., et al. (2008). Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 2538–2544.
- Muñoz-Rojas, M.V., Bay, L., Sanchez, L., van Kuijck, M., Ospina, S., Cabello, J.F., and Martins, A.M. (2011). Clinical manifestations and treatment of mucopolysaccharidosis type I patients in Latin America as compared with the rest of the world. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 1029–1037.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351–360.

- Okumiya, T., Kroos, M.A., Vliet, L.V., Takeuchi, H., Van der Ploeg, A.T., and Reuser, A.J.J. (2007). Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II. *Mol. Genet. Metab.* *90*, 49–57.
- Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K.M., Gregg, A., Noggle, S., and Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* *533*, 125–129.
- Parant, J.M., and Yeh, J.-R.J. (2016). Approaches to Inactivate Genes in Zebrafish. *Adv. Exp. Med. Biol.* *916*, 61–86.
- Parkinson-Lawrence, E.J., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, G.N., and Brooks, D.A. (2010). Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiol. Bethesda Md* *25*, 102–115.
- Pastores, G.M., Arn, P., Beck, M., Clarke, J.T.R., Guffon, N., Kaplan, P., Muenzer, J., Norato, D.Y.J., Shapiro, E., Thomas, J., et al. (2007). The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. *Mol. Genet. Metab.* *91*, 37–47.
- Platt, F.M., Boland, B., and Spoel, A.C. van der (2012). Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* *199*, 723–734.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., et al. (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* *154*, 1380–1389.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014a). CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat. Biotechnol.* *32*, 347–355.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014b). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* *32*, 347–355.
- Savitskaya, E.E., Musharova, O.S., and Severinov, K.V. (2016). Diversity of CRISPR-Cas-Mediated Mechanisms of Adaptive Immunity in Prokaryotes and Their Application in Biotechnology. *Biochem. Biokhimiia* *81*, 653–661.
- Schubert, D. (1989). The biological roles of heparan sulfate proteoglycans in the nervous system. *Neurobiol. Aging* *10*, 504-506-512.
- Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M., and Davidson, B.L. (2011). Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci.* *34*, 401–410.
- Schwank, G., Koo, B.-K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C.K., et al. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* *13*, 653–658.
- Scott, H.S., Guo, X.H., Hopwood, J.J., and Morris, C.P. (1992). Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics* *13*, 1311–1313.

- Settembre, C., Fraldi, A., Rubinsztein, D.C., and Ballabio, A. (2008). Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy. *Autophagy* 4, 113–114.
- Sharma, R., Anguela, X.M., Doyon, Y., Wechsler, T., DeKolver, R.C., Sproul, S., Paschon, D.E., Miller, J.C., Davidson, R.J., Shivak, D., et al. (2015). In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood* 126, 1777–1784.
- da Silva, F.H., Pereira, V.G., Yasumura, E.G., Tenório, L.Z., de Carvalho, L.P., Lisboa, B.C.G., Matsumoto, P.K., Stilhano, R.S., Samoto, V.Y., Calegare, B.F.A., et al. (2012). Treatment of adult MPSI mouse brains with IDUA-expressing mesenchymal stem cells decreases GAG deposition and improves exploratory behavior. *Genet. Vaccines Ther.* 10, 2.
- Templeton, S.P., and Perlman, S. (2008). Role of IFN-gamma responsiveness in CD8 T-cell-mediated viral clearance and demyelination in coronavirus-infected mice. *J. Neuroimmunol.* 194, 18–26.
- Tomanin, R., Zanetti, A., Zaccariotto, E., D’Avanzo, F., Bellettato, C.M., and Scarpa, M. (2012). Gene therapy approaches for lysosomal storage disorders, a good model for the treatment of mendelian diseases. *Acta Paediatr.* 101, 692–701.
- Tomatsu, S., Montañó, A.M., Oguma, T., Dung, V.C., Oikawa, H., de Carvalho, T.G., Gutiérrez, M.L., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Fukushi, M., et al. (2010). Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 141–150.
- Tschaharganeh, D.F., Lowe, S.W., Garippa, R.J., and Livshits, G. (2016). Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease in vivo. *FEBS J.*
- Valayannopoulos, V., and Wijburg, F. a (2011). Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 50 *Suppl* 5, v49-59.
- Vera, M., Le, S., Kan, S.-H., Garban, H., Naylor, D., Mlikotic, A., Kaitila, I., Harmatz, P., Chen, A., and Dickson, P. (2013). Immune response to intrathecal enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I patients. *Pediatr. Res.* 74, 712–720.
- Visigalli, I., Delai, S., Politi, L.S., Di Domenico, C., Cerri, F., Mrak, E., D’Isa, R., Ungaro, D., Stok, M., Sanvito, F., et al. (2010). Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood* 116, 5130–5139.
- Vitner, E.B., Platt, F.M., and Futerman, A.H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J. Biol. Chem.* 285, 20423–20427.
- Voit, R.A., Hendel, A., Pruett-Miller, S.M., and Porteus, M.H. (2013). Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. *Nucleic Acids Res.* gkt947.
- Warnes, G. (2015). Flow cytometric assays for the study of autophagy. *Methods San Diego Calif* 82, 21–28.

Wilcox, W.R. (2004). Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J. Pediatr.* 144, S3-14.

Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., Yan, Z., Li, D., and Li, J. (2013). Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 13, 659–662.

Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R.L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P.A., Jacks, T., and Anderson, D.G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 32, 551–553.

Zeitelhofer, M., Vessey, J.P., Xie, Y., Tübing, F., Thomas, S., Kiebler, M., and Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat. Protoc.* 2, 1692–1704.