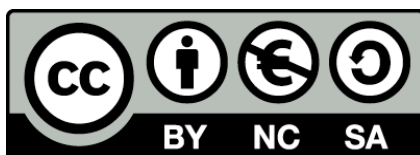




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**iPSCs, CRISPR/Cas9 y protocolos de diferenciación
basados en factores de transcripción para generar
nuevos modelos neuronales y astrocíticos
del síndrome de Sanfilippo**

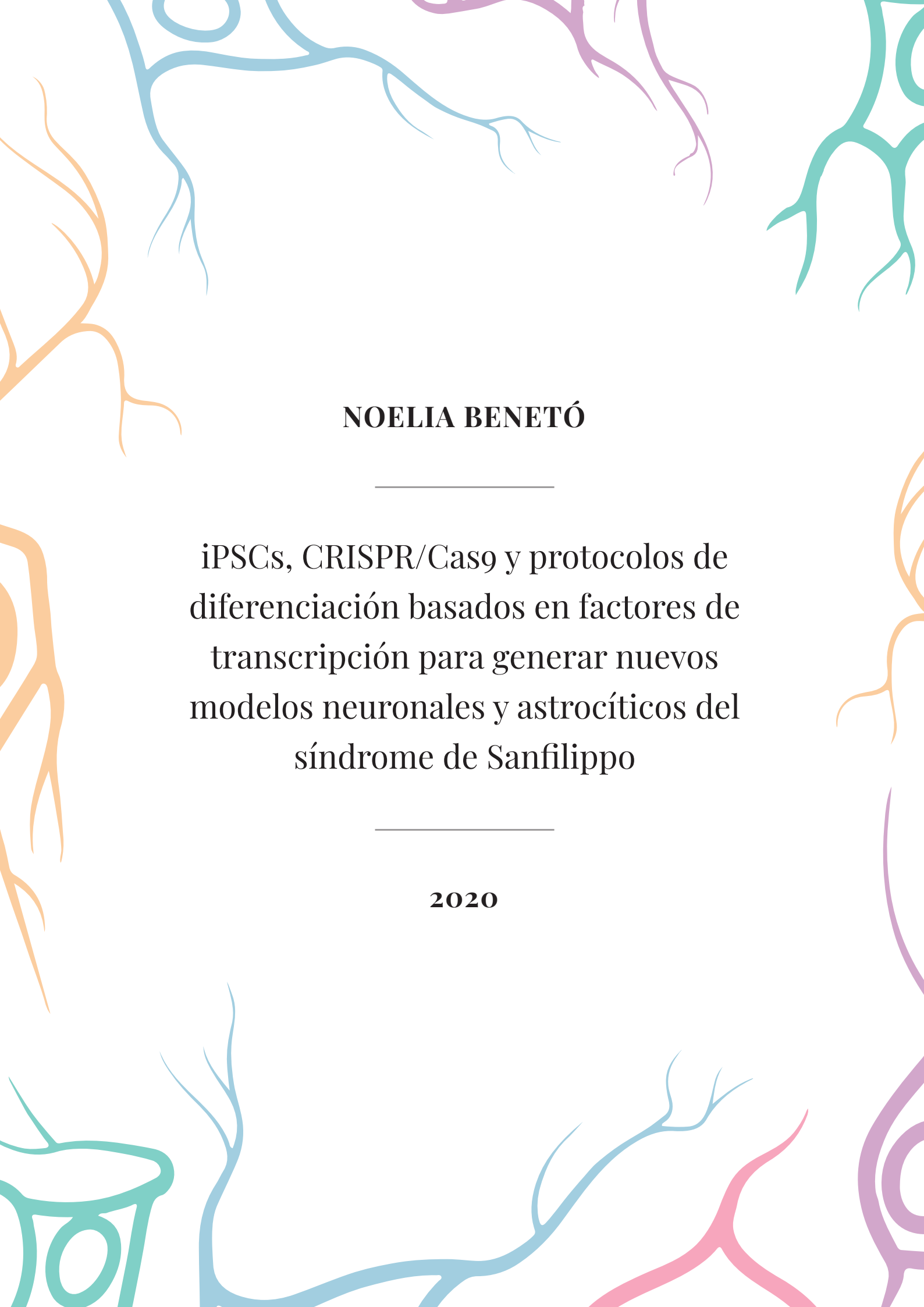
Noelia Benetó Gandia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

The background of the entire page is a stylized illustration of neurons. The cell bodies (soma) are represented by simple circles in various colors: orange, teal, purple, and pink. From these cell bodies, numerous branching processes (dendrites and axons) extend across the page in the same color palette. The lines are smooth and have a slightly hand-drawn feel. The overall composition is a dense, interconnected network of these colorful neural structures, filling the entire frame around the central text.

NOELIA BENETÓ

iPSCs, CRISPR/Cas9 y protocolos de
diferenciación basados en factores de
transcripción para generar nuevos
modelos neuronales y astrocíticos del
síndrome de Sanfilippo

2020



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**iPSCs, CRISPR/Cas9 y protocolos de diferenciación basados
en factores de transcripción para generar nuevos modelos
neuronales y astrocíticos del síndrome de Sanfilippo**

Memoria presentada por **Noelia Benetó Gandia** para optar al grado de
Doctora por la Universitat de Barcelona

Programa de Genética

Tesis dirigida por el **Dr. Isaac Canals Montferrer** i el Dr. **Daniel Grinberg Vaisman** en
el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de
la Universitat de Barcelona

Dr. Isaac Canals Montferrer

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

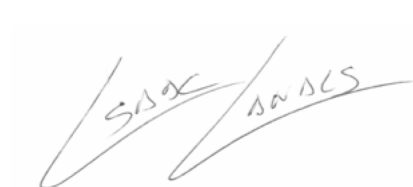
Noelia Benetó Gandia

Barcelona, 2020

La autora de la tesis doctoral, Noelia Benetó Gandía, y sus directores, Isaac Canals Montferrer y Daniel Grinberg Vaisman, quieren dejar constancia de que el presente trabajo ha sido dirigido también por la **Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués**, en igualdad de condiciones que los otros dos directores. Por razones administrativas, el nombre de la tercera codirectora no pudo constar oficialmente.

Barcelona, 11 de marzo de 2020

Noelia Benetó Gandia

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'ISAAC CANALS'.

Dr. Isaac Canals Montferrer

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. Los lisosomas	3
2. Enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs)	5
2.1. Aproximaciones terapéuticas en las LSDs	8
2.1.1. Terapia génica	8
2.1.2. Chaperonas farmacológicas	10
2.1.3. Reemplazamiento enzimático	11
2.1.4. Terapia de células madre	13
2.1.5. Terapia de reducción de sustrato	15
3. El síndrome de Sanfilippo	17
3.1. Heparán sulfato	17
3.1.1. Biosíntesis	19
3.1.2. Degradación	22
3.2. Clínica	23
3.3. Genética	24
3.3.1. Subtipo B	25
3.3.2. Subtipo C	26
3.4. Diagnóstico	28
3.5. Tratamiento para el síndrome de Sanfilippo	30
3.5.1. Terapia génica en el síndrome de Sanfilippo	30
3.5.2. Chaperonas farmacológicas en el síndrome de Sanfilippo	31
3.5.3. Reemplazamiento enzimático en el síndrome de Sanfilippo	31
3.5.4. Terapia de células madre en el síndrome de Sanfilippo	32
3.5.5. Terapia de reducción de sustrato en el síndrome de Sanfilippo	32
4. Modelos celulares de enfermedad: iPSCs	35
4.1. Reprogramación de células somáticas	36

4.2. Diferenciación de las iPSC a células del CNS	37
4.2.1. Diferenciación directa a neuronas	39
4.2.2. Diferenciación directa a astrocitos	39
4.3. Modelos celulares para el síndrome de Sanfilippo	40
5. CRISPR/Cas9	42
5.1. Origen, estructura y función	42
5.2. Métodos	43
5.2.1. Componentes	43
5.2.2. Introducción en las células	43
5.2.3. Mecanismo de acción	44
5.3. Variantes y aplicaciones	45
5.4. CRISPR/Cas9 e iPSC en la generación de nuevos modelos	46
OBJETIVOS	49
RESULTADOS	53
Informe de los directores de tesis acerca de la contribución de la doctoranda en cada artículo de esta tesis doctoral	55
Artículo 1	59
Artículo 2	69
Artículo 3	79
Artículo 4	101
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	131
REFERENCIAS	135
AGRADECIMIENTOS	159
ANEXO	163

TABLAS

Tabla 1. Enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs)	5
Tabla 2. Subtipos del síndrome de Sanfilippo.....	17

FIGURAS

Figura 1. Papel de los lisosomas según el tipo celular.....	4
Figura 2. Patogenicidad y estrategias terapéuticas de las LSDs	7
Figura 3. Terapia génica	9
Figura 4. Correlación actividad enzimática - fenotipo de las LSDs	10
Figura 5. Chaperonas farmacológicas.....	11
Figura 6. Reemplazamiento enzimático	12
Figura 7. Terapia de células madre	14
Figura 8. Terapia de reducción de sustrato	15
Figura 9. Tipos de GAGs	18
Figura 10. Estructura y biosíntesis del HS.....	20
Figura 11. Actividades glicosiltransferasas para la elongación del HS.....	21
Figura 12. Degradación del HS en el lisosoma, enzimas y enfermedades	23
Figura 13. Pacientes de Sanfilippo	24
Figura 14. Gen <i>NAGLU</i>	25
Figura 15. Enzima <i>NAGLU</i>	26
Figura 16. Gen <i>HGSNAT</i>	27
Figura 17. Enzima <i>HGSNAT</i>	28
Figura 18. Diagnóstico sistemático de MPSs	29
Figura 19. Reprogramación, diferenciación y aplicaciones de iPSCs	36
Figura 20. Desarrollo neural <i>in vivo</i> y diferenciación <i>in vitro</i>	38
Figura 21. Vectores lentivirales para la obtención de neuronas	39
Figura 22. Vectores lentivirales para la obtención de astrocitos.....	40
Figura 23. Técnicas de edición génica	42
Figura 24. Estructura del sistema CRISPR/Cas9	43
Figura 25. Introducción del sistema CRISPR/Cas9 en la célula.....	44
Figura 26. Alternativas en la reparación del DNA tras un corte de doble cadena	45
Figura 27. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9.....	46
Figura 28. Obtención de líneas isogénicas.....	47
Figura 29. Bases moleculares Sanfilippo C.....	113
Figura 30. Hipótesis acción siRNAs	114
Figura 31. Generación iPSCs y CRISPR/Cas9	117
Figura 32. Diferenciación iPSCs a neuronas y astrocitos.....	119
Figura 33. Diferenciación iPSCs y siRNAs	123
Figura 34. Líneas isogénicas derivadas de iPSCs WT.....	127

ABREVIACIONES

AAV: virus adenoasociados (del inglés *Adeno Associated Viruses*)

BBB: barrera hematoencefálica (del inglés *Blood-Brain Barrier*)

CNS: sistema nervioso central (del inglés *Central Nervous System*)

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente y agrupadas (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

GAGs: glicosaminoglicanos (del inglés *glycosaminoglycans*)

HR: recombinación homóloga (del inglés *homologous recombination*)

HS: heparán sulfato (del inglés *Heparan Sulfate*)

iAs: astrocitos inducidos (del inglés *induced astrocytes*)

iNs: neuronas inducidas (del inglés *induced neurons*)

iPSCs: células madre pluripotentes inducidas (del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*)

LSDs: enfermedades de almacenamiento lisosomal (del inglés *Lisosomal Storage Diseases*)

MPSs: mucopolisacaridosis (del inglés *mucopolysaccharidosis*)

NHEJ: unión de extremos no homólogos (del inglés *non-homologous end joining*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

RNAi: RNA de interferencia (del inglés *RNA interference*)

RNP: ribonucleoproteína (del inglés *ribonucleoprotein*)

SRT: terapia de reducción de sustrato (del inglés *Substrate Reduction Therapy*)

TALENs: nucleasas efectoras similares al activador de transcripción (del inglés *transcription activator-like effector nucleases*)

WT: fenotipo salvaje (del inglés *wild-type*)

ZFNs: nucleasas de dedos de zinc (del inglés *zinc finger nucleases*)



INTRODUCCIÓN

1. Los lisosomas

Los lisosomas son orgánulos subcelulares ácidos presentes en todas las células eucariotas nucleadas. Descritos en el año 1955 por Christian De Duve (De Duve et al, 1955), son heterogéneos en tamaño (100-500 μm de diámetro), forma y distribución (Mellman, 1989). Siempre se ha conocido a estos orgánulos por ser los encargados del catabolismo celular, tanto de material intracelular (mediante autofagia) como extracelular (mediante pinocitosis, endocitosis y fagocitosis).

Las enzimas hidrolíticas (lipasas, nucleasas, proteasas, entre otras) son las encargadas de degradar macromoléculas en este orgánulo. Esta degradación da lugar a energía y es también una fuente de material para sintetizar nuevas macromoléculas. Por ello, los lisosomas son clave en muchos procesos celulares básicos y de gran importancia como la reparación y reciclaje de componentes dañados (Lawrence & Zoncu, 2019; Perera & Zoncu, 2016; Settembre et al, 2013). Además, estas funciones adquieren papeles muy variados y de gran relevancia según el tipo celular, siendo los lisosomas esenciales, por ejemplo, en las sinapsis entre neuronas, la autofagia en hepatocitos, la fagocitosis en macrófagos, o la presentación de antígenos por parte de linfocitos B (Figura 1) (Oyarzún et al, 2019).

En una única célula podemos encontrar centenares de lisosomas. Estos contienen en su lumen ácido más de 60 tipos de hidrolasas solubles y proteínas accesorias, pero, además, este orgánulo está delimitado por una única membrana con más de 120 proteínas, incluyendo proteínas lisosomales de membrana y proteínas transitorias (Braulke & Bonifacino, 2009).

Las enzimas lisosomales se sintetizan en su forma nativa, se N-glicosilan en el retículo endoplasmático, y posteriormente son transportadas al aparato de Golgi donde adquieren modificaciones importantes para ser reconocidas por los receptores adecuados una vez liberadas al sistema endolisosomal. Las proteínas solubles pueden presentar señales, que pueden ser secuencias polipeptídicas mostradas en la superficie proteica o modificaciones glucídicas específicas, siendo la más común la adquisición de manosa-6-fosfato (Bajaj et al, 2019).

Cabe destacar que no todas las enzimas solubles con modificaciones específicas acaban en el lisosoma, algunas de ellas escapan de la unión con sus receptores y se excretan al compartimento extracelular. Desde ahí, existen mecanismos para recapturar estas enzimas, ya sean propias o de células colindantes, para que lleguen al compartimento lisosomal (Bajaj et al, 2019). Este es el fundamento de la terapia de reemplazamiento enzimático para muchas enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs, del inglés *Lisosomal Storage Diseases*), y la razón por la cual esta aproximación terapéutica tiene menos éxito en LSDs cuya proteína deficiente es de membrana.

En los últimos años, con la identificación del factor de transcripción TFEB como regulador transcripcional clave en la función y biogénesis lisosomal, las funciones del lisosoma se han ampliado. Se ha visto que, mediante la modulación de TFEB, la actividad del sistema lisosomal se coordina en respuesta adaptativa a distintas necesidades celulares (Sardiello et al, 2009; Settembre et al, 2011). Por ejemplo, muchas quinasas y fosfatasa son capaces de modular TFEB, pero entre ellas destaca la quinasa mTORC1. Esta es una proteína clave

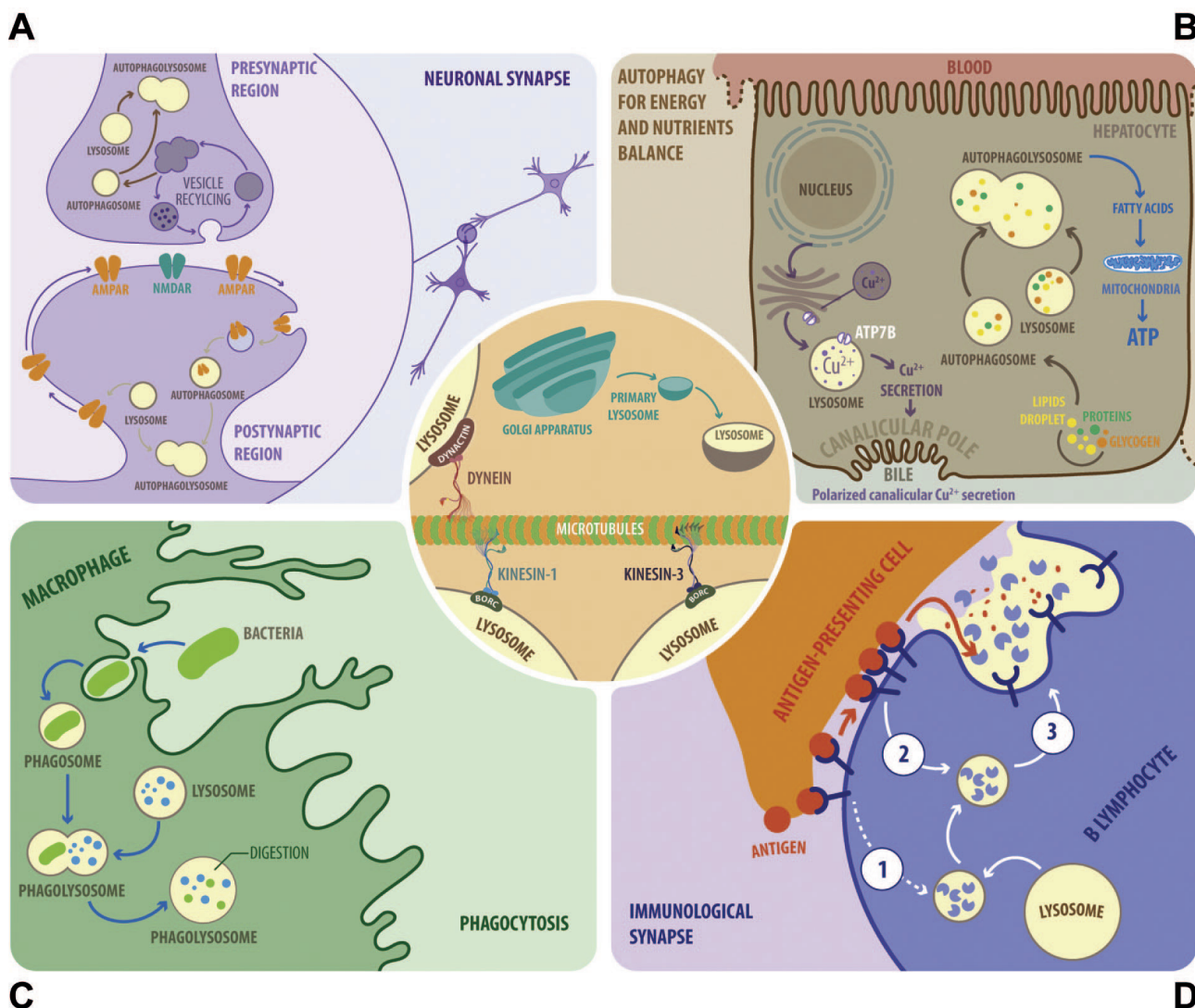


Figura 1. Papel de los lisosomas en funciones de gran relevancia según el tipo celular. (A) la sinapsis neuronal en el CNS, (B) autofagia en los hepatocitos para la generación de energía, balance de nutrientes y liberación de Cu^{2+} al canalículo biliar, (C) fagocitosis de patógenos en los macrófagos, (D) presentación de antígenos por parte de los linfocitos B, (central) la kinesina y la dineína son, respectivamente, los motores de movimiento anterógrado y retrógrado de los lisosomas en la célula (Oyarzún et al, 2019).

en la regulación del crecimiento que, en respuesta a la presencia de nutrientes, es capaz de fosforilar TFEB y secuestrarlo en el citoplasma evitando así su traslocación al núcleo. Con TFEB fuera del núcleo, genes específicos del lisosoma no son transcritos y funciones como la biogénesis lisosomal o la autofagia quedan inhibidas para facilitar un contexto anabólico (Lawrence et al, 2018; Sancak et al, 2010; Saxton & Sabatini, 2017; Zoncu et al, 2011).

Dadas sus extensas funciones, los lisosomas tienen un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular, así como en el correcto funcionamiento del sistema endolisosomal. Cualquier desregulación de su actividad puede desencadenar errores metabólicos a muchos niveles, incluyendo afectaciones en otros orgánulos y en el funcionamiento celular en general. Estas alteraciones en la función normal del lisosoma son la causa principal de las LSDs, pero también tienen consecuencias en otras muchas enfermedades, por ejemplo, autoinmunes (como artritis reumatoide o Crohn) o neurológicas (Alzheimer, Parkinson o Huntington) (Bonam et al, 2019). Sin embargo, en este trabajo nos vamos a centrar en las LSDs.

2. Enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs)

Las LSDs son un grupo de enfermedades genéticas, hereditarias, que afectan a la correcta función del lisosoma y están causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas relacionadas con este orgánulo. Según algunos autores, en las LSDs se pueden incluir alrededor de 70 enfermedades (Cox, 2015; Platt et al, 2018), o solo unas 50 (Boustany, 2013; Bonam et al, 2019). Estas diferencias se deben a si se incluyen únicamente las deficiencias de enzimas lisosomales (alrededor de 50), o también otros trastornos que implican proteínas de otros orgánulos relacionados con el lisosoma, o con la producción de lipofuscina (lipofuscinosis) (Boustany, 2013; Cox, 2015; Platt et al, 2018). En este trabajo consideraremos como LSDs solo las deficiencias enzimáticas descritas clásicamente (Tabla 1).

Tabla 1. Enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs) clasificadas según la naturaleza química del sustrato acumulado (traducido, adaptado y complementado de Boustany et al, 2013; Fragaki et al, 2013; Platt et al, 2018).

Tipo de enfermedad		Implicación neurológica	Proteína o enzima deficiente (gen causante)	Sustrato acumulado	Terapia específica	
Esfingolipidosis						
Fabry		Sí/No	α-Galactosidasa A (<i>GLA</i>)	Globotriaosilceramida	ERT ^α , Ch ^α , SRT ^β y GT ^β	
Lipogranulomatosis de Farber		No	Ceramidasa ácida (<i>ASAH1</i>)	Ceramida		
Gaucher tipo I		No	β-Glucosidasa (<i>GBA</i>) y su activador Saposina-C	Glucocerebrósidos y Glucosilesfingosina	ERT ^α , SRT ^α , Ch ^β y SRT ^β	
Gaucher tipos II and III		Sí				
Niemann–Pick	Tipo A	Sí	Esfingomielinasa (<i>SMPD1</i>)	Esfingomielina	ERT ^β	
	Tipo B					
GM1-gangliosidosis		Sí	β-Galactosidasa (<i>GLB1</i>)	Gangliósidos GM1, queratán sulfato y oligosacáridos		
GM2-gangliosidosis (Sandhoff)		Sí	β-Hexosaminidasa A y B (<i>HEXA</i> y <i>HEXB</i>)	Gangliósidos GM2, glicolípidos GA2 y oligosacáridos	Ch ^β	
GM2-gangliosidosis (Tay–Sachs)		Sí	β-Hexosaminidasa A (<i>HEXA</i>)	Gangliósidos GM2, glicoesfingolípidos y oligosacáridos	Ch ^β	
GM2-gangliosidosis (deficiencia en el activador de GM2)		Sí	Activador de gangliósidos GM2 (<i>GM2A</i>)	Gangliósidos GM2 y glicoesfingolípidos		
GM3-gangliosidosis		Sí	Sintasa GM3 (<i>ST3GAL5</i>)	Lactosilceramida y derivados alternativos del gangliósido GM3		
Leucodistrofia metacromática		Sí	Arilsulfatasa A (<i>ARSA</i>) y prosaposina (<i>PSAP</i>)	Sulfatidos	HSCT ^α , ERT ^β y GT ^β	
Krabbe		Sí	Galactosilceramidasa (<i>GALC</i>)	Galactocerebrosida y psicósina	HSCT ^α	
Mucopolisacaridosis						
MPS I	Hurler	Sí	α-L-Iduronidasa (<i>IDUA</i>)	Dermatán sulfato y heparán sulfato	HSCT ^α	GT ^β y otras ^β
	Hurler–Scheie y Scheie				ERT ^α	
MPS II (Hunter)		Sí	Iduronidasa-2-sulfatasa (<i>IDS</i>)	Dermatán sulfato y heparán sulfato	ERT ^α , GT ^β y otras ^β	
MPS IIIA (Sanfilippo A)		Sí	N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (<i>SGSH</i>)	Heparán sulfato	ERT ^β y GT ^β	
MPS IIIB (Sanfilippo B)		Sí	N-acetil-α-glucosaminidasa (<i>NAGLU</i>)		ERT ^β , GT ^β y SRT ^β	
MPS IIIC (Sanfilippo C)		Sí	Heparan-α-glucosamido N-acetiltransferasa (<i>HGSNAT</i>)			
MPS IIID (Sanfilippo D)		Sí	N-acetilglucosamino-6-sulfatasa (<i>GNS</i>)			

MPS IVA (Morquio A)	Sí/No	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (<i>GALNS</i>)	Queratán sulfato y condroitina 6-sulfato	ERT ^a
MPS IVB (Morquio B)	No	β-Galactosidasa (<i>GLB1</i>)	Queratán sulfato	
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Sí/No	Arilsulfatasa B (<i>ARSB</i>)	Dermatán sulfato	ERT ^a y GT ^β
MPS VII (Sly)	Sí	β-Glucuronidasa (<i>GUSB</i>)	Dermatán sulfato, heparán sulfato y condroitina 6-sulfato	ERT ^a
MPS IX	Sí/No	Hialuronidasa 1 (<i>HYAL1</i>)	Hialuronano	
Enfermedades de almacenamiento de glucógeno				
Pompe	Sí	α-Glucosidasa lisosomal (<i>GAA</i>)	Glucógeno	ERT ^a y GT ^β
Oligosacaridosis				
α-Manosidosis	Sí	α-Manosidasa lisosomal (<i>MAN2B1</i>)	Oligosacáridos ricos en manosa	ERT ^a y ERT ^β
β-Manosidosis	Sí	β-Manosidasa (<i>MANBA</i>)	Man(β1>4) N-acetilglucosamina	
Fucosidosis	Sí	α-Fucosidasa (<i>FUCA1</i>)	Oligosacáridos ricos en fucosa, glicoproteínas y glicolípidos	
Aspartilglucosaminuria	Sí	Aspartilglucosaminidasa (<i>AGA</i>)	Aspartilglucosamina	
Enfermedad de Schindler	Sí	α-N-acetilgalactosaminidasa (<i>NAGA</i>)	Glucopéptidos sialilados o asialos y glicosfingolípidos	
Sialidosis o Mucopolidosis I	Sí/No	Neuraminidasa-1 (<i>NEU1</i>)	Oligosacáridos y glucopéptidos sialilados, LAMP1 y precursores de la proteína amiloide	
Galactosialidosis	Sí/No	Catepsina A (<i>CTSA</i>)	Oligosacáridos y glucopéptidos sialilados, LAMP2 y péptidos bioactivos	
Mucopolidosis II	Sí/No	N-acetilglucosamino-1-fosfotransferasa subunidades α/β (<i>GNP-TAB</i>)	Oligosacáridos, glicosaminoglicanos y glicosfingolípidos	
Mucopolidosis III	No	N-acetilglucosamino-1-fosfotransferasa subunidad γ (<i>GNPTG</i>)		
Enfermedades de proteínas integrales de membrana				
Cistinosis	No	Cistinosina (<i>CTNS</i>)	Cistina	Otras ^a
Enfermedad de Danon	Sí	LAMP2 (<i>LAMP2</i>)	Debris citoplasmático y glucógeno	
Síndrome de mioclonías de acción - insuficiencia renal	Sí/No	Proteína de membrana del lisosoma 2 (<i>SCARB2</i>)	Desconocido	
Enfermedad de Salla	Sí	Sialina (<i>SLC17A5</i>)	Ácidos siálicos	
Enfermedad de Niemann-Pick tipo C1 y C2	Sí	Transportador de colesterol intracelular NPC (<i>NPC1</i> y <i>NPC2</i>)	Colesterol y esfingolípidos	SRT ^a y otras ^β
Mucopolidosis IV	Sí	Mucopolina 1 (<i>MCOLN1</i>)	Lípidos y mucopolisacáridos	
Tipos adicionales de enfermedad				
Deficiencia múltiple en sulfatasa	Sí/No	Enzima generadora de formilglicina (<i>SUMF1</i>)	Sulfatidos	
Enfermedad de Wolman y enfermedad de almacenamiento del éster de colesterol	Sí/No	Lipasa ácida lisosomal (<i>LIPA</i>)	Colesterol ésteres, triglicéridos y otros lípidos	ERT ^a

Ch= chaperonas farmacológicas, ERT= terapia de reemplazamiento enzimático, GT= terapia génica, HSCT= terapia de células madre hematopoyéticas y SRT= terapia de reducción de sustrato. ^aTerapia aprobada o ^βensayo clínico.

Por lo tanto, consideraremos las LSDs como un grupo de alrededor de 50 enfermedades metabólicas hereditarias causadas por mutaciones en genes que codifican alguna proteína lisosomal. Estas mutaciones dan lugar a proteínas aberrantes que no pueden llevar a

cabo correctamente su función, principalmente catabólica. Estas alteraciones en su función dan lugar a un acúmulo gradual de sustratos parcialmente degradados en el interior de este orgánulo, que acaban afectando al correcto funcionamiento de todo el sistema celular (Platt et al, 2018) (Figura 2, rojo).

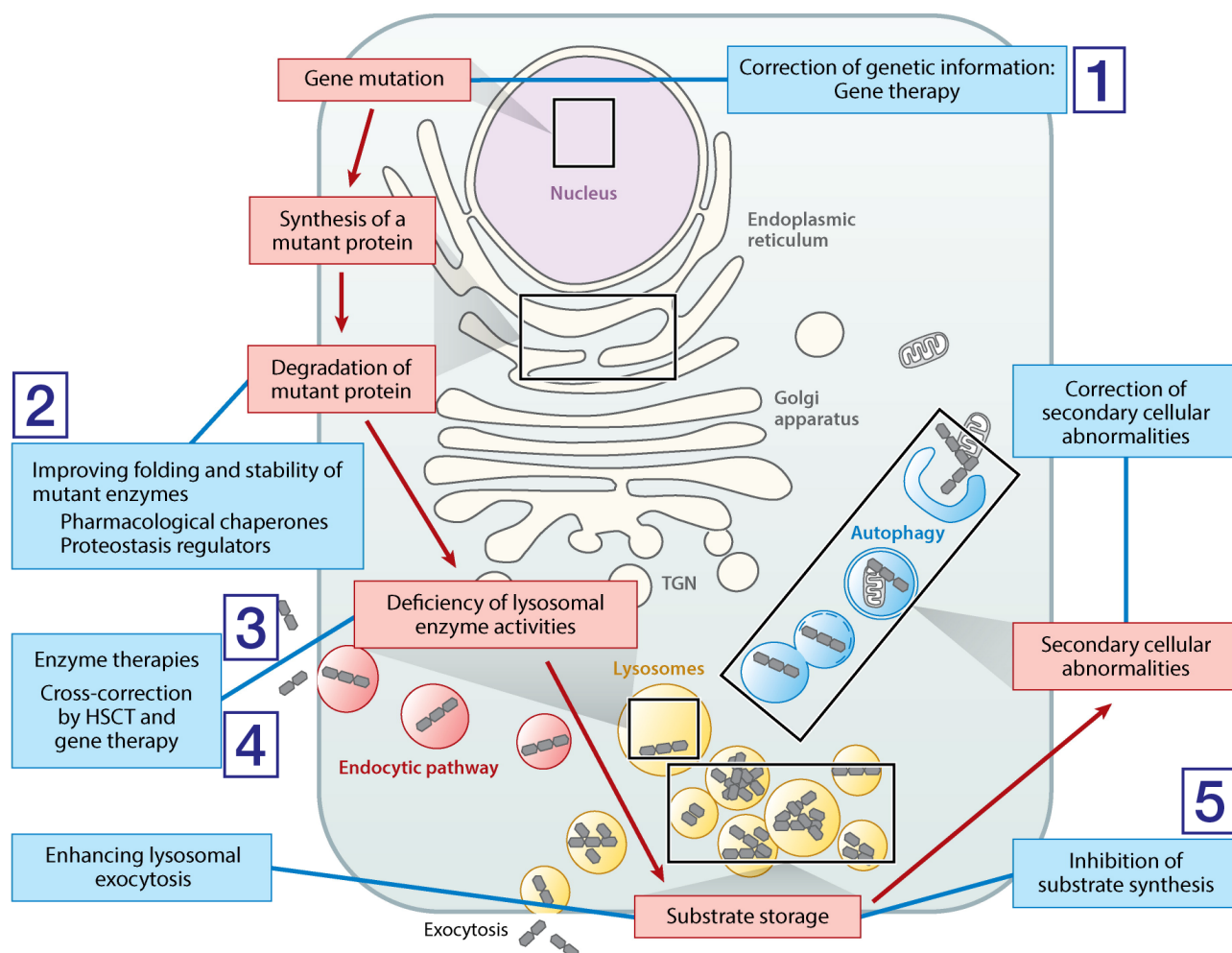


Figura 2. Cascada de patogenicidad (ROJO) y estrategias terapéuticas de las LSDs (AZUL). **ROJO**, desde arriba: las mutaciones en genes que codifican proteínas relacionadas con funciones lisosomales causan las LSDs, estas proteínas mutadas se pueden degradar y retener en el ER, tener una glicosilación anormal, y/o tener problemas en el tráfico a través del aparato de Golgi hasta el lisosoma. Las deficiencias en enzimas lisosomales causan acumulación de sustratos parcialmente degradados en el lisosoma, dando lugar a consecuencias secundarias en otras funciones celulares. **AZUL**, desde arriba: cada estrategia terapéutica se focaliza en un evento distinto de la cascada de patogenicidad de las LSDs. (1) La mutación inicial en el gen puede ser corregida mediante terapia génica introduciendo una copia funcional de ese gen. (2) La enzima mutante se puede estabilizar y evitar su degradación, así como incrementar su función residual mediante el uso de chaperonas farmacológicas. (3) También se puede proporcionar directamente una copia funcional del enzima para que se incorpore a las células afectadas, o se puede introducir esta como un precursor o incluso (4) puede ser secretada por células trasplantadas que sean capaces de generar una proteína funcional (células de paciente modificadas o células madre hematopoyéticas). Se puede reducir el acúmulo de sustrato aumentando la exocitosis lisosomal, o bien (5) reduciendo la síntesis de dicho sustrato. Finalmente, se puede actuar sobre las funciones celulares que se han visto afectadas de forma secundaria (adaptada de Parenti et al, 2015a).

La mayoría de LSDs son de herencia monogénica autosómica recesiva y se consideran individualmente enfermedades raras debido a su baja incidencia. Esta incidencia depende de la región geográfica y la población analizada, por lo que la información es relativamente limitada y variable (Kingma et al, 2015; Platt et al, 2018). Globalmente, se considera a la enfermedad de Gaucher como la LSD de mayor incidencia con 1 caso cada

57.000 nacidos vivos, y la sialidosis con 1 caso cada 4.200.000 nacidos vivos es una de las de menor incidencia (Ortolano et al, 2014). Sin embargo, al valorar la incidencia en conjunto de las LSDs vemos que llega a ser de aproximadamente 1 caso cada 5.000 nacidos vivos (Platt et al, 2018; Bonam et al, 2019).

La característica común que encontramos en las LSDs es el acúmulo de macromoléculas en el lisosoma, pero este material acumulado difiere en cada enfermedad dependiendo de cuál sea la función de la proteína defectuosa. Las LSDs se pueden clasificar tanto por la proteína defectuosa como por la naturaleza química del sustrato acumulado, siendo esta última la clasificación más utilizada (Parenti et al, 2015a). En la Tabla 1 se listan las distintas LSDs clasificadas según el sustrato acumulado.

Aunque los lisosomas se distribuyen de forma ubicua en los distintos tipos celulares del organismo, las manifestaciones clínicas de cada LSD serán diferentes. Esto es debido a que un tipo celular concreto solo puede almacenar un sustrato y/o metabolito específico si se encarga de procesarlo o sintetizarlo en su función normal. Es por ello que el acúmulo se dará principalmente en aquellos tejidos y órganos en los que el reciclado de ese sustrato sea mayor y la deficiencia de esa proteína tenga mayores consecuencias (Parenti et al, 2015a; Platt et al, 2018).

Las manifestaciones clínicas de las LSDs son muy variables, desde leves a severas y, por ejemplo, en los pacientes se suelen encontrar alteraciones neurológicas, viscerales, hematológicas, esqueléticas u oculares. Las LSDs provocan invalidez física y, en la mayoría de casos, también neurológica, teniendo un gran impacto en la salud general de los pacientes, llegando incluso a reducir su esperanza de vida (Parenti et al, 2015a).

2.1. Aproximaciones terapéuticas en las LSDs

Aunque en los últimos años ha habido un avance muy considerable en el desarrollo de terapias para las LSDs, la mayoría siguen sin disponer de tratamientos efectivos al ser enfermedades crónicas y con manifestaciones multiorgánicas. En muchos casos los pacientes aún siguen siendo tratados exclusivamente para paliar sus síntomas. Esta dificultad en el desarrollo de tratamientos se ve más agudizada en el caso de LSDs con alteraciones neurológicas, debido a la dificultad para llegar al sistema nervioso central (CNS, del inglés *Central Nervous System*) (Tabla 1) (Platt, 2018).

A continuación, se exponen las principales estrategias terapéuticas en las que se basan las actuales investigaciones para las LSDs (Figura 2, azul), enfatizando las LSDs con afectación neurológica.

2.1.1. Terapia génica

Con la terapia génica se pretende introducir una versión funcional del gen afectado en el paciente. Esta introducción se hará mediante la inyección de virus adenoasociados (AAV, del inglés *Adeno Associated Viruses*), retrovirus o lentivirus, bien de forma intravenosa o directamente en el cerebro. De esta forma, tras la transcripción y traducción del gen introducido, la enzima obtenida llevará a cabo la función hasta entonces deficiente (Figura 3).

Además, esta enzima también podrá ser secretada y capturada por otras células (mediante receptores de manosa-6-fosfato), ya que es difícil que todas sean infectadas inicialmente por los virus.

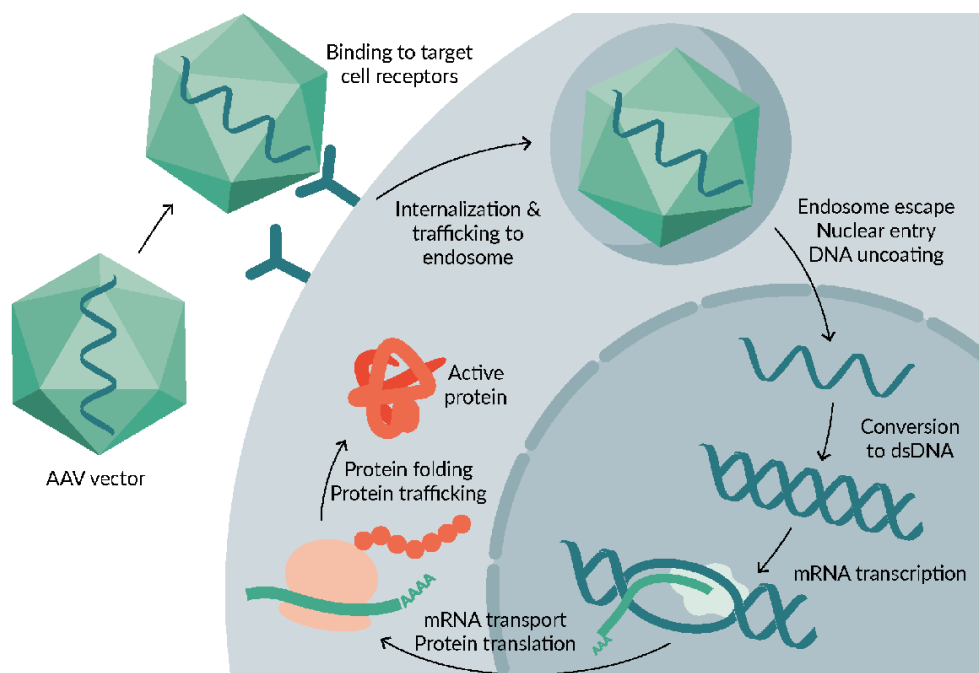


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de la terapia génica. Una vez el virus llega a su célula diana es internalizado y dirigido al núcleo. Una vez allí introduce su material genético que incluye, en este caso, el gen deficiente en la LSD que se quiere tratar. De esta forma, la célula ya dispone del gen correcto, el cual se puede transcribir y traducir para obtener la proteína activa sin ningún tipo de alteración (Li et al, 2019b).

Las LSDs son buenas candidatas para la terapia génica al tratarse de enfermedades monogénicas. Además, su expresión enzimática no está sujeta a mecanismos de regulación muy complejos y con solo incrementarla ligeramente se pueden obtener beneficios clínicos (Figura 4). Estos beneficios serán mucho mayores al aplicar la terapia de forma presintomática o en las fases iniciales de la enfermedad, antes de que alteraciones irreparables se hayan manifestado, y esto solo es posible si se realiza un rápido diagnóstico (Platt, 2018). Sin embargo, también hay que tener en cuenta la limitación de que algunos pacientes presentan anticuerpos contra el vector usado para la administración de la terapia, por ello hay investigaciones enfocadas en desarrollar nuevos vectores menos inmunogénicos.

Inicialmente, los beneficios de la terapia génica se limitaban más a órganos periféricos por la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *Blood-Brain Barrier*). Sin embargo, el descubrimiento de que algunos serotipos, como AAV9 o AAVrh10, se pueden administrar de forma intravenosa y corregir los síntomas periféricos al mismo tiempo que atraviesan la BBB, ha permitido la exploración de las inyecciones intravenosas como una buena alternativa para tratar LSDs con afectaciones neurológicas (Hocquemiller et al, 2016).

Actualmente, ninguna LSD dispone de un tratamiento aprobado con terapia génica, pero hay varios ensayos clínicos en marcha usando esta estrategia, como se puede ver en la Tabla 1. Estos ensayos clínicos analizan la efectividad de la terapia génica por diferentes

métodos, como en el caso de Sanfilippo A y B en los que se usa inyección intravenosa del AAV9 (NCT02716246; NCT04088734; NCT03315182), o la inyección intracerebral bien del AAVrh10 (NCT01474343; NCT03612869) o del rAAV2/5 (NCT03300453).

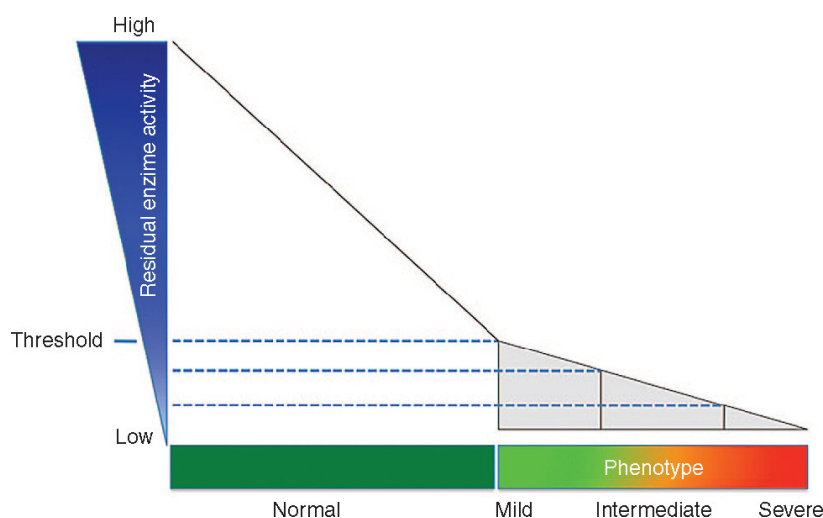


Figura 4. Correlación entre la actividad residual y el fenotipo de las LSDs. Se ha visto que, según la actividad enzimática residual, el fenotipo puede ser más o menos severo en las LSDs, y se ha especulado sobre la existencia de un límite (*threshold*) de aproximadamente el 10% a partir del cual no habría síntomas de enfermedad (Parenti et al, 2015b).

2.1.2. Chaperonas farmacológicas

Las chaperonas son proteínas que encontramos en las células y que se encargan de ayudar a otras proteínas a adquirir su correcta conformación, ya que cuando se encuentran mutadas o mal plegadas no son funcionales y pueden llegar a dificultar el funcionamiento normal de la célula (Figura 5). Ese es el caso de muchas LSDs. En algunos casos, las proteínas mal plegadas pueden evitar esta disfuncionalidad adquiriendo un correcto plegamiento, aumentando así su actividad a niveles suficientes para que se aprecien beneficios clínicos (Figura 4) (Parenti et al, 2015b). Esta es la base de los tratamientos con chaperonas farmacológicas, en los que se usan compuestos con mayor capacidad para llevar a cabo un correcto plegamiento de las enzimas afectadas (Figura 5).

La única chaperona farmacológica aprobada para LSDs es el migalastat para la enfermedad de Fabry, que se aprobó en mayo de 2016. Sin embargo, está solo indicado para un subgrupo de pacientes con mutaciones respondedoras (Germain et al, 2016), comúnmente de cambio de sentido (*missense*), aunque también pueden ser pequeñas inserciones o deleciones que no alteren la pauta de lectura (Benjamin et al, 2017). Estas mutaciones respondedoras son aproximadamente un 45% del total de mutaciones identificadas (Benjamin et al, 2017). Para maximizar la mejora enzimática de esta estrategia terapéutica se requiere de dosis diarias, algo a destacar al tratarse de tratamientos con un elevado coste.

Como se ve en la Tabla 1, hay varias LSDs con ensayos clínicos basados en chaperonas farmacológicas, incluyendo algunas que tienen manifestaciones neurológicas. Esto es debido a que muchas de estas moléculas, incluyendo el migalastat, pueden llegar al CNS y potencialmente reducir los síntomas neurológicos. Ensayos clínicos para enferme-

dades como Gaucher (NCT01463215, NCT03950050, NCT00465062; Narita et al, 2016) o Tay-Sachs y Sandhoff (NCT01102686) analizan esta opción (Parenti et al, 2015b; Platt, 2018; Platt et al, 2018).

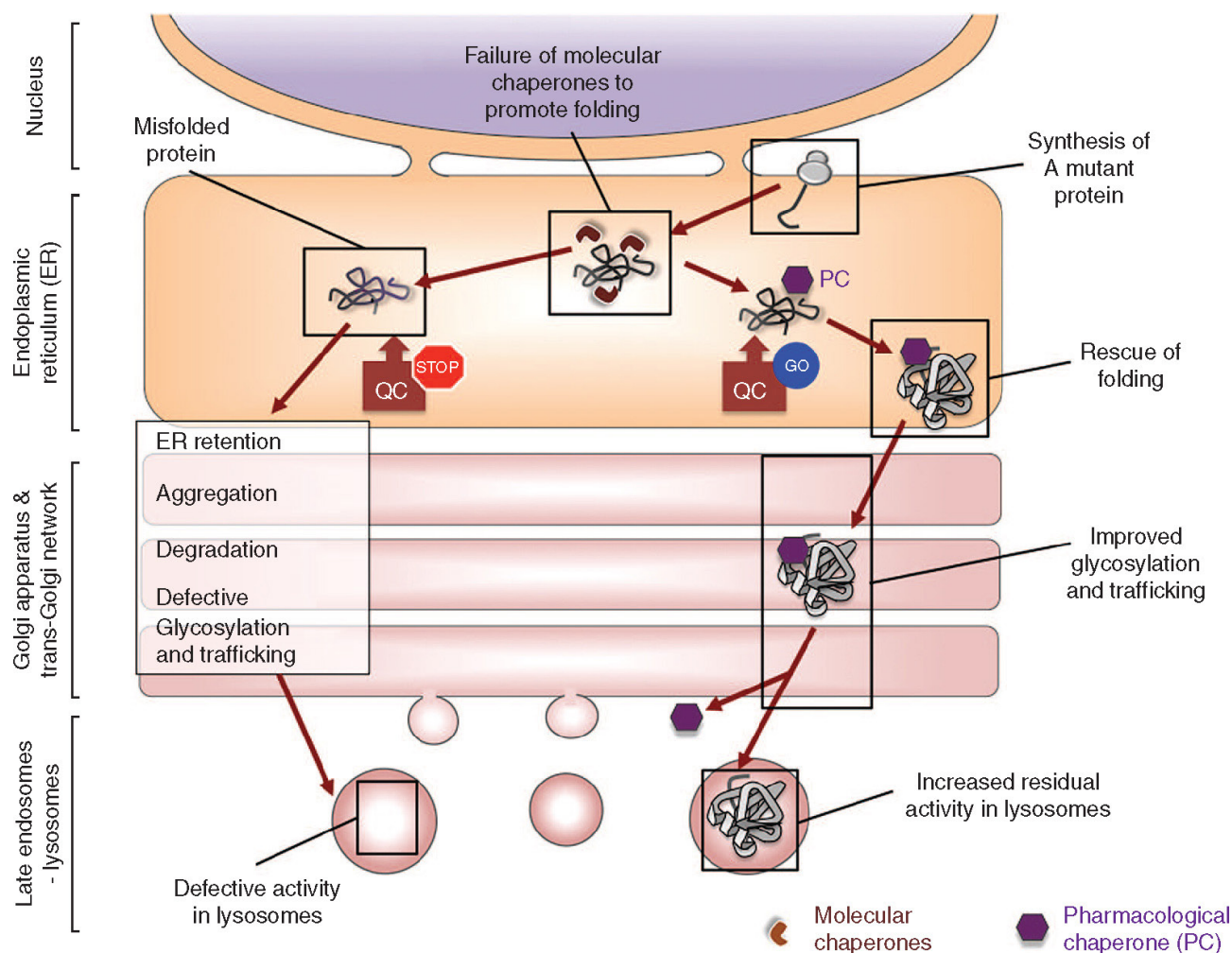


Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de las chaperonas farmacológicas. Cuando se sintetiza en el retículo endoplasmático (ER) una proteína mutante y las chaperonas moleculares endógenas no pueden ayudar a su correcto plegamiento, el control de calidad (QC) de la célula inducirá a su degradación produciendo así deficiencia de ese enzima en la célula. Por otro lado, las chaperonas farmacológicas tienen una mayor capacidad de ayudar en el plegamiento correcto de esas enzimas, permitiendo así que superen el QC y la enzima llegue a su destino subcelular concreto pudiendo tener una actividad suficiente para obtener beneficios clínicos (Parenti et al, 2015b).

Sin embargo, a parte del elevado coste de este tratamiento, el inconveniente principal de esta aproximación terapéutica es que no resulta efectiva para todas las mutaciones descritas. Por ello, una estrategia que se está estudiando actualmente es la terapia combinada de chaperonas farmacológicas con terapia de reemplazamiento enzimático (Ishay et al, 2018).

2.1.3. Reemplazamiento enzimático

La terapia de reemplazamiento enzimático implica la administración de la versión funcional del enzima deficiente de la LSD que se está tratando. Normalmente se administra esta enzima por vía intravenosa desde donde llega a las células diana, a las que suele in-

corporarse mediante los receptores de manosa-6-fosfato (Figura 6). Una vez en el interior, esta enzima lleva a cabo su función, degradando así el sustrato acumulado.

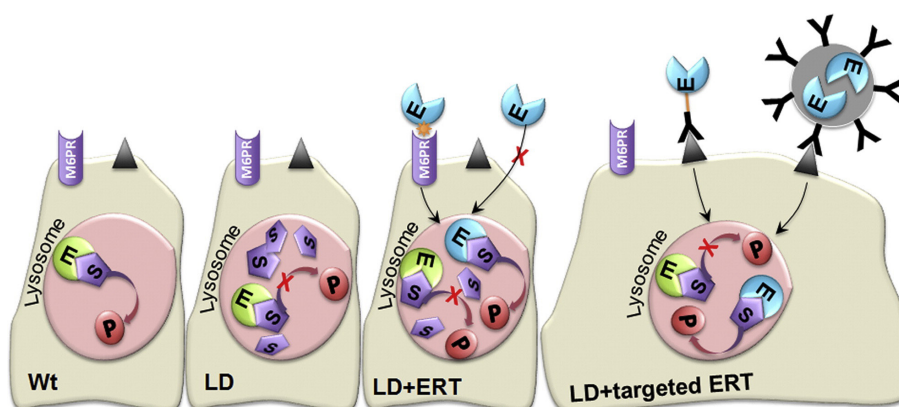


Figura 6. Esquema del funcionamiento de la terapia de reemplazamiento enzimático (ERT). En una situación normal (Wt), la enzima lisosomal E (amarilla) llega al lisosoma y funciona correctamente, degradando su sustrato (S), obteniendo su producto (P). En una situación de LSD (LD), esta E es incapaz de llevar a cabo su función de degradación, por lo que el S se acumula dando lugar a la patología. Cuando se tratan las células LD con ERT (LD+ERT), la enzima recombinante E* (azul) marcada con manosa-6-fosfato (círculo naranja) se le suministra al paciente y será endocitada por las células LD, y como esta E* sí es funcional, puede degradar el sustrato que hasta el momento se estaba acumulando en los lisosomas. Si se quiere dirigir esta E* de forma específica a un tipo celular (LD+targeted ERT), se puede marcar con anticuerpos específicos que se unan a la superficie de esa célula, que acabará endocitando las E* que llevarán a cabo la función de degradación en el lisosoma como en el caso LD+ERT (Solomon & Muro, 2018).

Es la estrategia terapéutica más extendida entre las LSDs: hay un total de 10 terapias aprobadas para LSDs basadas en terapia de reemplazamiento enzimático, y otros cinco ensayos clínicos basados en esta aproximación terapéutica para otras LSDs (Tabla 1) (Parenti et al, 2015a; Bonam et al, 2019). Pero, aunque está siendo un tratamiento efectivo para muchas LSDs, también tiene limitaciones.

Como muchas otras terapias, la de reemplazamiento enzimático tiene un elevado coste y debe ser administrada de forma frecuente para que la actividad enzimática se mantenga en niveles óptimos. Últimamente se ha intentado aumentar el tiempo de vida medio de estas enzimas recombinantes y así poder distanciar las dosis, reduciendo los costes y haciéndola menos invasiva. También se está intentando producir estas enzimas en plantas, lo cual permite ajustar más el coste de esta terapia. Sin embargo, actualmente el rango de coste de la terapia de reemplazamiento enzimático sigue siendo de 50.000-200.000 dólares/año (Solomon & Muro, 2018).

Otro obstáculo que encontramos en la terapia de reemplazamiento enzimático son las frecuentes respuestas inmunitarias de los pacientes tratados, que pueden tener consecuencias tanto en la efectividad del tratamiento como en la propia salud del paciente. Se ha visto que pacientes con ciertos niveles endógenos de la enzima infundida presentan mayor inmunotolerancia que aquellos que no tienen (Kishnani et al, 2010). Factores como la similitud entre la enzima recombinante infundida y la endógena, el fondo genético del paciente o su estado fisiopatológico global, también influyen en esta inmunotolerancia. Antihistamínicos, corticoides, antipiréticos o incluso la inducción de inmunotolerancia son

diferentes estrategias que se están llevando a cabo para evitar estas dificultades derivadas del tratamiento (Solomon & Muro, 2018).

Por otro lado, en muchos casos también ocurre que la enzima recombinante administrada de forma intravenosa no es capaz de llegar a su tejido de destino. Este puede ser el caso de enzimas que por no estar correctamente glicosiladas no pueden ser captadas por los receptores de la célula diana, como se vio por ejemplo en el síndrome de Sanfilippo B (Zhao & Neufeld, 2000). Por otro lado, ciertos tipos celulares tienen de por sí niveles muy reducidos de ciertos receptores que les dificultan poder captar estas enzimas circulantes, como es el caso de los macrófagos en la enfermedad de Gaucher (Zhu et al, 2004), entre otras.

Sin embargo, cabe destacar que la mayor limitación que presenta la terapia de reemplazamiento enzimático es que la enzima no puede atravesar la BBB (Bonam et al, 2019; Solomon & Muro, 2018). Para algunas LSDs con afectaciones neurológicas hay terapia de reemplazamiento enzimático en ensayo clínico o ya aprobada (como Gaucher o Sanfilippo, Tabla 1), pero esto no significa que el CNS se vea beneficiado tras el tratamiento, sino que en muchos casos son únicamente las manifestaciones somáticas las que presentan una mejora (Solomon & Muro, 2018). Actualmente hay muchos esfuerzos puestos en superar este obstáculo, como aplicar modificaciones que permitan a estas enzimas atravesar la BBB, o usar nanomateriales para su introducción segura y eficiente directamente en el CNS, como por ejemplo mediante inyecciones intracerebroventriculares o intratecales (Bonam et al, 2019).

2.1.4. Terapia de células madre

La terapia de células madre se basa en introducir en el paciente células sanas que pueden repoblar ciertos tejidos y pasar a ser una fuente continua de enzimas funcionales. Estas enzimas pueden ser secretadas al espacio extracelular y/o a la circulación sanguínea, desde donde pueden ser capturadas y endocitadas por las células afectadas, en las cuales llevarán a cabo su función degradativa en sustitución de la enzima defectiva (Figura 7).

A pesar del creciente conocimiento en biología celular, solo la terapia de células madre basada en células madre hematopoyéticas tiene un recorrido notorio en cuanto a tratamiento para LSDs. Clásicamente, esta terapia se ha aplicado usando células de donantes sanos y haciendo un trasplante de médula ósea, un proceso muy invasivo. Como modalidad terapéutica, esta es una de las primeras terapias biológicas aplicadas en las LSDs con éxito, siendo el primer paciente tratado un caso de MPS tipo I (Hurler) en 1981 (Hobbs et al, 1981). Sin embargo, la terapia de células madre hematopoyéticas clásica tiene numerosas limitaciones, siendo la principal la identificación de un donante compatible, así como la inmunosupresión del paciente tratado para evitar un rechazo del trasplante (Platt, 2018). Por otro lado, algunas de las limitaciones que se comentaron en la terapia de reemplazamiento enzimático también son aplicables a esta estrategia, como que algunos tejidos tienen pocos receptores que les permitan captar las enzimas circulantes, o la dificultad que estas pueden tener para cruzar la BBB y tratar síntomas neuropáticos.

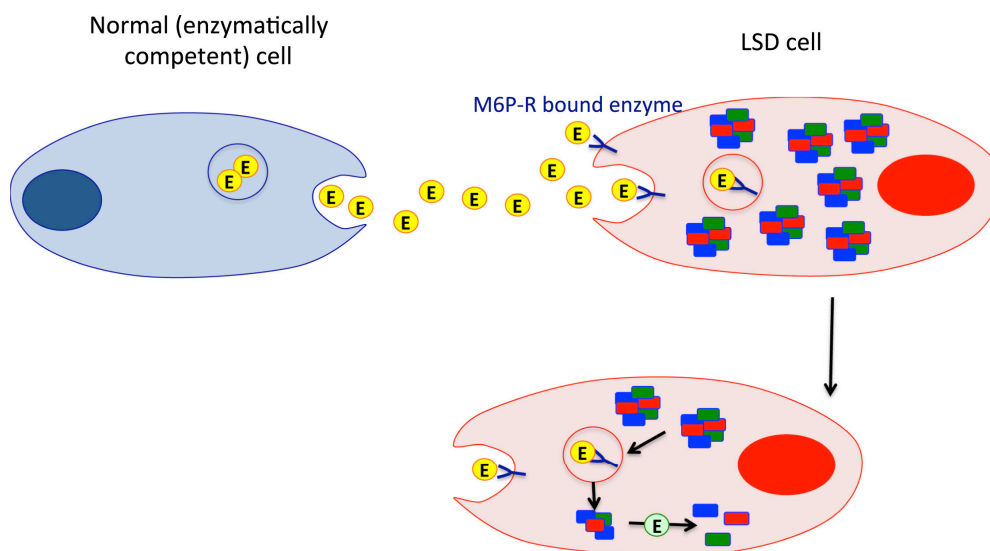


Figura 7. Esquema del funcionamiento de la terapia de células madre. En las células afectadas (células LSD), las enzimas endógenas no son funcionales y el sustrato se acumula dando lugar a la enfermedad. Células sanas (enzimáticamente competentes) pueden crear un nicho en el organismo afectado y secretar continuamente enzimas funcionales que pueden ser captadas y endocitadas por los receptores de las células LSD, como los receptores de manosa-6-fosfato. Estas enzimas funcionales (amarillas) pueden llevar a cabo la función degradativa que la enzima endógena no podía, y permitir así que el resto de enzimas correctos de las células LSD (verde) sigan con los procesos degradativos correspondientes (Biffi, 2017).

Con el tiempo, la fuente para realizar el trasplante de células madre hematopoyéticas pasó a ser el cordón umbilical y no la médula ósea, y la mejor selección de donantes y de condiciones ha permitido reducir los efectos secundarios y aumentar la eficacia del tratamiento. Actualmente el trasplante de células madre hematopoyéticas es la terapia básica para pacientes con Hurler, y es eficaz para evitar la aparición de síntomas neurológicos (Boelens et al, 2013), siendo más útil cuanto más joven es el paciente, lo cual refuerza la necesidad de un diagnóstico temprano.

Actualmente, el mayor avance que ha presentado esta terapia ha sido la aplicación de trasplantes autólogos. En esta nueva estrategia, se aíslan células hematopoyéticas progenitoras del paciente a tratar, que serán modificadas *ex vivo* mediante terapia génica introduciéndoles una copia sana del gen mutado. Así, las propias células del paciente serán las que produzcan y/o secreten la enzima sana, evitando muchos de los efectos secundarios que presentaba el trasplante clásico, como el rechazo o la búsqueda de donantes (Platt et al, 2018).

Otros tipos de terapias de células madre están aún siendo estudiadas y es necesaria una mayor investigación al respecto (Siddiqi & Wolfe, 2016). Existe una gran variedad de tipos de células madre con mucho potencial para tratar distintas enfermedades con afectación neurológica, como es el caso de las células madre neurales (Ho et al, 2010; Shihabuddin & Cheng, 2011). Estas han mostrado tener cierta eficacia en modelos animales, pero aún no han sido aprobadas para tratar estas enfermedades (Jeyakumar et al, 2009; Shihabuddin et al, 2004; Snyder et al, 1995). Futuras terapias basadas en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) podrían resultar prometedoras.

2.1.5. Terapia de reducción de sustrato

El objetivo de la terapia de reducción de sustrato (SRT, del inglés *Substrate Reduction Therapy*) es reducir la biosíntesis del sustrato acumulado, de forma que así se puedan recuperar niveles normales de dicho sustrato en las células, ya que las enzimas mutantes suelen tener en muchos casos actividad residual (Figura 8). Cuanto mayor sea la actividad residual de las enzimas en los individuos tratados, mayores beneficios obtendrán de un tratamiento basado en SRT.

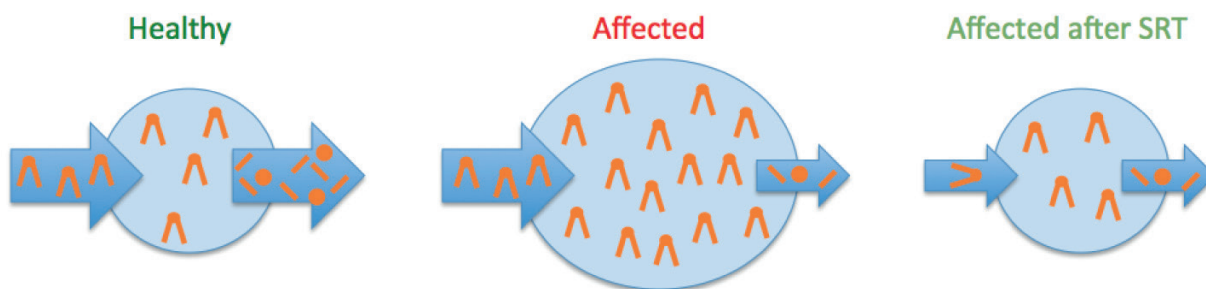


Figura 8. Esquema del principio teórico de la SRT. Las células sanas (*healthy*) tienen un equilibrio entre la síntesis y la degradación del sustrato, mientras que aquellas células afectadas por una LSD (*affected*) tienen muy reducida la degradación de dicho sustrato en comparación a su síntesis, teniendo como consecuencia el acúmulo de este y el desarrollo de la enfermedad. La SRT tiene como objetivo reducir la síntesis del sustrato acumulado, de forma que se recupere de nuevo el equilibrio entre síntesis y degradación (imagen cedida por Isaac Canals Montferrer, tesis doctoral, 2015).

Las moléculas usadas como tratamiento son inhibidores de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis del sustrato que no puede ser degradado, pero nunca serán inhibidores completos ya que niveles basales del sustrato que sintetizan son necesarios para la supervivencia celular. El concepto fue inicialmente propuesto por Radin para tratar la enfermedad de Gaucher (Radin, 1996), y ya actualmente las moléculas miglustat y eliglustat están aprobadas como SRT para tratar aquellos enfermos de Gaucher tipo 1 que no responden a la terapia de reemplazamiento enzimático, y miglustat también está aprobada para tratar pacientes de Niemann-Pick tipo C (Platt et al, 1996; Lachmann et al, 2004). Ambas moléculas bloquean la glucosilceramida sintasa, inhibiendo así el primer paso de la síntesis de los glicosfingolípidos y reduciendo su acúmulo.

Normalmente las moléculas usadas para SRT son estables a temperatura ambiente, se pueden administrar de forma oral, y debido a su pequeño tamaño no son inmunogénicas. Además, algunas de estas moléculas, como el miglustat, pueden cruzar la BBB y llegar al CNS. Es por ello que el miglustat se usa también para frenar el progreso de los síntomas neurológicos, además de los somáticos, de enfermos con Niemann-Pick tipo C, aunque los resultados son variables (Pineda et al, 2018).

Aunque la SRT presenta algunas ventajas respecto a la terapia de reemplazamiento enzimático, tiene también una menor eficacia y por eso no suele ser la primera opción terapéutica. Esta menor eficacia es debida, entre otras cosas, a una reducción más lenta del sustrato acumulado, siendo un fenómeno mucho más destacable en el CNS. Es por ello que la terapia debe ser aplicada antes de que las manifestaciones clínicas sean claras, lo

cual lleva a recalcar de nuevo la importancia de un diagnóstico temprano. Por otro lado, estas moléculas presentan otras limitaciones relacionadas con su metabolismo en el organismo. Por ejemplo, el miglustat causa diarrea osmótica, mientras que el eliglustat requiere determinar primero la forma de citocromo P450 que tiene el individuo a tratar para evitar su uso en metabolizadores ultra-rápidos porque no llegarían a dosis efectivas. Además, este tratamiento, al igual que los nombrados en anteriores apartados, tiene un elevado coste (Platt et al, 2018).

En teoría, la SRT podría ser desarrollada para todas las LSDs, pero hasta el momento solo se han podido identificar moléculas inhibidoras específicas de la ruta biosintética de los esfingolípidos. Existen otras moléculas que actualmente están siendo evaluadas en ensayos clínicos para distintas LSDs (Tabla 1).

El uso de RNA de interferencia (RNAi, del inglés *RNA interference*) para mediar la supresión de enzimas biosintéticas es una SRT que se está explorando actualmente para tratar algunas LSDs, ya que ha tenido éxito en otros campos como la diabetes o la oncología (Ramachandran & Ignacimuthu, 2013; McClorey & Wood, 2015). Se han llevado a cabo experimentos tanto en modelos celulares (Diaz-Font et al, 2006; Dziedzic et al, 2010; Kaidonis et al, 2010) como en modelos animales (Clayton et al, 2014), con resultados prometedores.

3. El síndrome de Sanfilippo

El síndrome de Sanfilippo es una LSD, concretamente una mucopolisacaridosis (MPS, del inglés *mucopolysaccharidosis*) (Tabla 1), por lo que también es conocido como MPS III. Las MPS en general se caracterizan por problemas en la degradación de glucosaminoglucanos (GAGs, del inglés *glycosaminoglycans*), y en cada MPS los GAGs acumulados son diferentes (Tabla 1). En el caso del síndrome de Sanfilippo el GAG acumulado es el heparán sulfato (HS, del inglés *Heparan Sulfate*) (Andrade et al, 2015; Fedele, 2015; Neufeld & Muenzer, 2001).

Esta es una enfermedad rara con un patrón de herencia monogénico autosómico recesivo, y está causada por mutaciones en genes que codifican enzimas implicadas en el catabolismo del HS. Existen cuatro subtipos de este síndrome, dependiendo de cuál sea la enzima deficiente (Tabla 2). Estas enzimas fueron identificadas a finales del siglo pasado (subtipo A: Kresse & Neufeld, 1972; subtipo B: O'Brien, 1972; subtipo C: Klein et al, 1978; subtipo D: Kresse et al, 1980), y posteriormente se identificaron los genes causantes (subtipo A: Scott et al, 1995; subtipo B: Zhao et al, 1996; subtipo C: Fan et al, 2006 y Hřebíček et al, 2006; subtipo D: Robertson et al, 1988). Todas estas enzimas son integrantes de la ruta de degradación del HS y la disminución en su actividad causa la enfermedad, dando lugar al acúmulo de moléculas parcialmente degradadas de HS en los lisosomas y su excreción a los fluidos corporales (Neufeld & Muenzer, 2001).

Tabla 2. Subtipos del síndrome de Sanfilippo indicando la enzima deficitaria en la enfermedad, el gen causante y su localización en el genoma, así como el número de mutaciones conocidas en ese gen y rango de la incidencia en Europa de cada subtipo según población estudiada (adaptada de Andrade et al, 2015; Zelei et al, 2018; HGMD® Professional 2019.4).

Subtipo de Sanfilippo	Enzima deficitaria	Gen y locus	Mutaciones conocidas	Incidencia (cada 100.000 nacidos vivos)
Sanfilippo A (OMIM #252900)	heparán-N-sulfatasa (EC:3.10.1.1)	<i>SGSH</i> 17q25.3	138	0-1,62
Sanfilippo B (OMIM #252920)	α -N-acetilglucosaminidasa (EC:3.2.1.50)	<i>NAGLU</i> 17q21.2	171	0-0,72
Sanfilippo C (OMIM #252930)	heparán- α -glucosaminido N-acetiltransferasa (EC:2.3.1.78)	<i>HGSNAT</i> 8p11.21	71	0-0,34
Sanfilippo D (OMIM #252940)	N-acetilglucosamino 6-sulfatasa (EC:3.1.6.14)	<i>GNS</i> 12q14.3	25	0-0,1

La incidencia conjunta del síndrome de Sanfilippo en Europa va desde 0,38 (Suiza) a 1,89 (Países Bajos) casos cada 100.000 nacidos vivos, dependiendo de la población estudiada (Khan et al, 2017). Si miramos los subtipos por separado, Sanfilippo A y Sanfilippo B son los más comunes (Tabla 2) (Andrade et al, 2015; Khan et al, 2017; Zelei et al, 2018).

3.1. Heparán sulfato

El síndrome de Sanfilippo está causado por una alteración en la degradación del HS que tiene como consecuencia su acúmulo en el interior y exterior celular. Es por ello que conocer la función y dinámica celular de esta molécula nos puede ayudar a entender las

consecuencias a nivel molecular de su acúmulo, así como a plantear posibles estrategias terapéuticas o formas de diagnóstico.

El HS es un tipo de GAG (anteriormente llamados mucopolisacáridos), que son largos polisacáridos lineales formados por repeticiones de disacáridos y que normalmente también contienen grupos sulfato, por lo que están cargados de forma negativa (Morla, 2019). Los GAGs forman parte de los proteoglicanos, que son proteínas altamente glicosiladas. Un proteoglicano básico está formado por una proteína central que tiene unidas una o más cadenas de GAGs mediante enlaces covalentes. Las cadenas de GAGs que forman un proteoglicano pueden ser del mismo tipo o no. Algunos proteoglicanos se encuentran en la matriz extracelular, mientras que otros se localizan en la membrana de las células o almacenados en el interior (Esko et al, 2009; Köwitsch et al, 2018). Los GAGs tienen muchas funciones, las cuales dependen de cada subtipo de GAG (Morla, 2019). Existen 6 tipos de GAGs, clasificados según el disacárido que se repite (Figura 9).

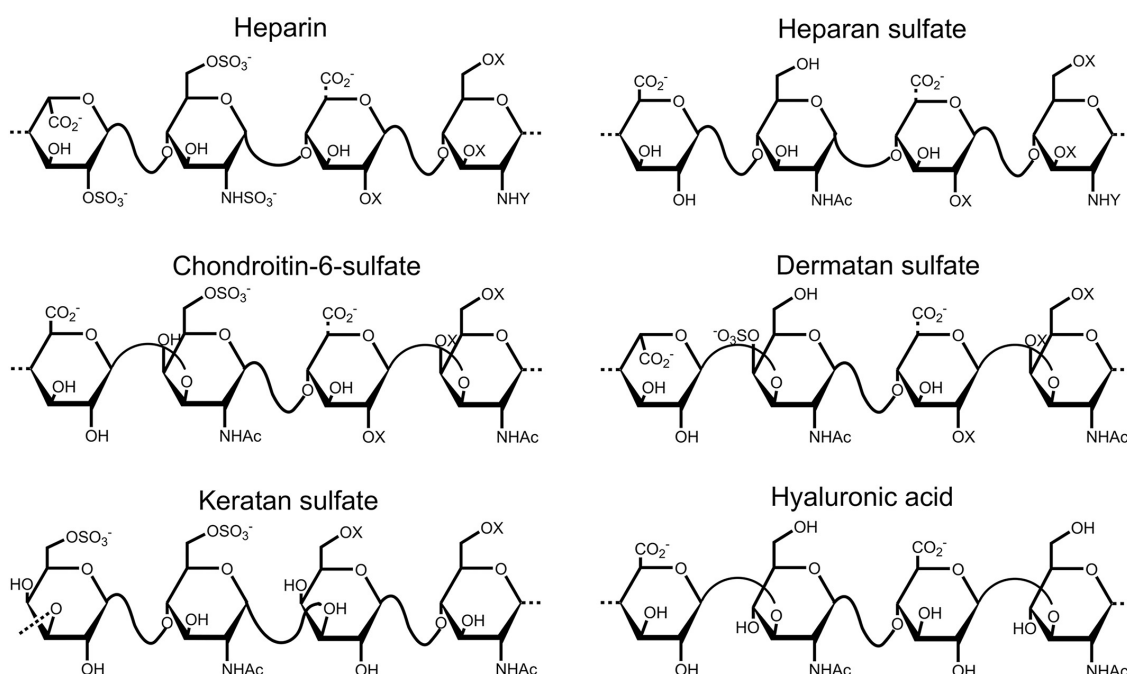


Figura 9. Tipos de GAGs según el disacárido que se repite. X= -OH o -OSO₃⁻; Y= -Ac o -OSO₃⁻ (Köwitsch et al, 2018).

Tanto la heparina como el HS están compuestos por glucosamina, que puede estar N-acetilada o N-sulfatada, unida mediante distintos enlaces a ácidos urónicos, bien ácido idurónico o ácido glucurónico. Concretamente, en el caso del HS el disacárido más predominante es el formado por el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina (Köwitsch et al, 2018). El HS puede ser excretado de la célula, pero normalmente se encuentra formando parte de los proteoglicanos de HS tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular (Sarrazin et al, 2011). Los proteoglicanos de HS participan en muchas funciones celulares diferentes, como adhesión celular y movilidad, formación de la matriz extracelular, reconocimiento de diferentes factores como receptores o correceptores, secreción de vesículas, transporte y presentación de quimiocinas, o secuestro de factores de crecimiento

y morfogenos (Bishop et al, 2007; Li & Kusche-Gullberg, 2016; Sarrazin et al., 2011). Estas son funciones fundamentales en el desarrollo y la homeostasis, lo cual queda reflejado por el hecho de que los proteoglicanos de HS se encuentran presentes en todas las especies de vertebrados e invertebrados conocidas (De Pasquale & Pavone, 2019; Li & Kusche-Gullberg, 2016).

3.1.1. Biosíntesis

Para que se inicie la síntesis del HS, es necesario disponer de una proteína central que sirva de estructura para el proteoglicano de HS. La cantidad disponible de estas proteínas centrales puede ser un factor limitante en la biosíntesis del HS. Una vez se dispone de una proteína central, el primer paso de la síntesis del HS se da en el retículo endoplasmático, mientras que el resto del proceso se llevará a cabo en el aparato de Golgi. Todas las enzimas implicadas en la síntesis del HS, excepto una sulfotransferasa, son proteínas transmembrana.

El proceso de biosíntesis del HS empieza con la adición a la proteína central de un tetrasacárido de unión formado por xilosa (Xyl)- galactosa (Gal)- galactosa- ácido glucurónico (GlcA), mediante la O-glicosilación de un residuo de serina (Ser) de dicha proteína central, dando lugar a GlcA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser, quedando el GlcA en el extremo reductor. Esta acción está llevada a cabo de forma secuencial por diferentes enzimas: XYLT1/XYLT2, GalT-1, GalT-2 y GlcAT-1 (De Pasquale & Pavone, 2019) (Figura 10). Este tetrasacárido es común en diferentes GAGs: HS, condroitín sulfato, dermatán sulfato y heparina, y puede sufrir diferentes modificaciones que lo encaminen a ser un GAG u otro (Kreuger & Kjellén, 2012).

Si el tetrasacárido formado va a dar lugar al GAG HS, el siguiente paso implica la elongación de la cadena, que está mediada por glicosiltransferasas de la familia de las exosinas (EXTs). Hay cinco genes que codifican las proteínas EXT en mamíferos: *EXT1*, *EXT2*, *EXTL1* (*EXTL* de *EXT-like*), *EXTL2* y *EXTL3*. El primer paso en la elongación de la cadena del HS lo llevan a cabo las proteínas EXTLs, y consiste en la adición de una N-acetilglucosamina (GlcNAc) al ácido glucurónico (GlcA) del tetrasacárido de unión inicial. A continuación, la elongación sigue por la acción de EXT1 y EXT2, que añaden de forma alterna unidades de GlcA y GlcNAc. Al mismo tiempo que se lleva a cabo la elongación, este polímero va sufriendo diferentes modificaciones producidas por una epimerasa y cuatro tipos diferentes de sulfotransferasas que lo acabarán convirtiendo en un polisacárido complejo con residuos de glucosamina N-acetilada y N-sulfatada, unidades de GlcA y ácido idurónico, y otros grupos O-sulfatados en diferentes posiciones (Bishop et al, 2007; Busse-Wicher et al, 2014; Kreuger & Kjellén, 2012; Zhang et al, 2016) (Figura 10).

Como podemos ver, las proteínas de la familia de las EXTs son las que actúan de forma específica en la formación del HS, ya que el tetrasacárido de unión es común con otros GAGs. Es por ello, que estos cinco genes que las codifican son clave en la síntesis del HS. Estos genes se expresan de forma ubicua en todos los tejidos excepto *EXTL1*, cuya expresión se limita a tejido esquelético, cerebro, piel y corazón (Busse-Wicher et al, 2014). Además, su función aún no ha sido del todo esclarecida, aunque se detectó que tenía actividad N-acetilglucosamina transferasa I (GlcNAc-TI) *in vitro* (Kim et al, 2001), es decir, la capacidad de iniciar la elongación (Figura 11). De momento tampoco existe ningún modelo animal defi-

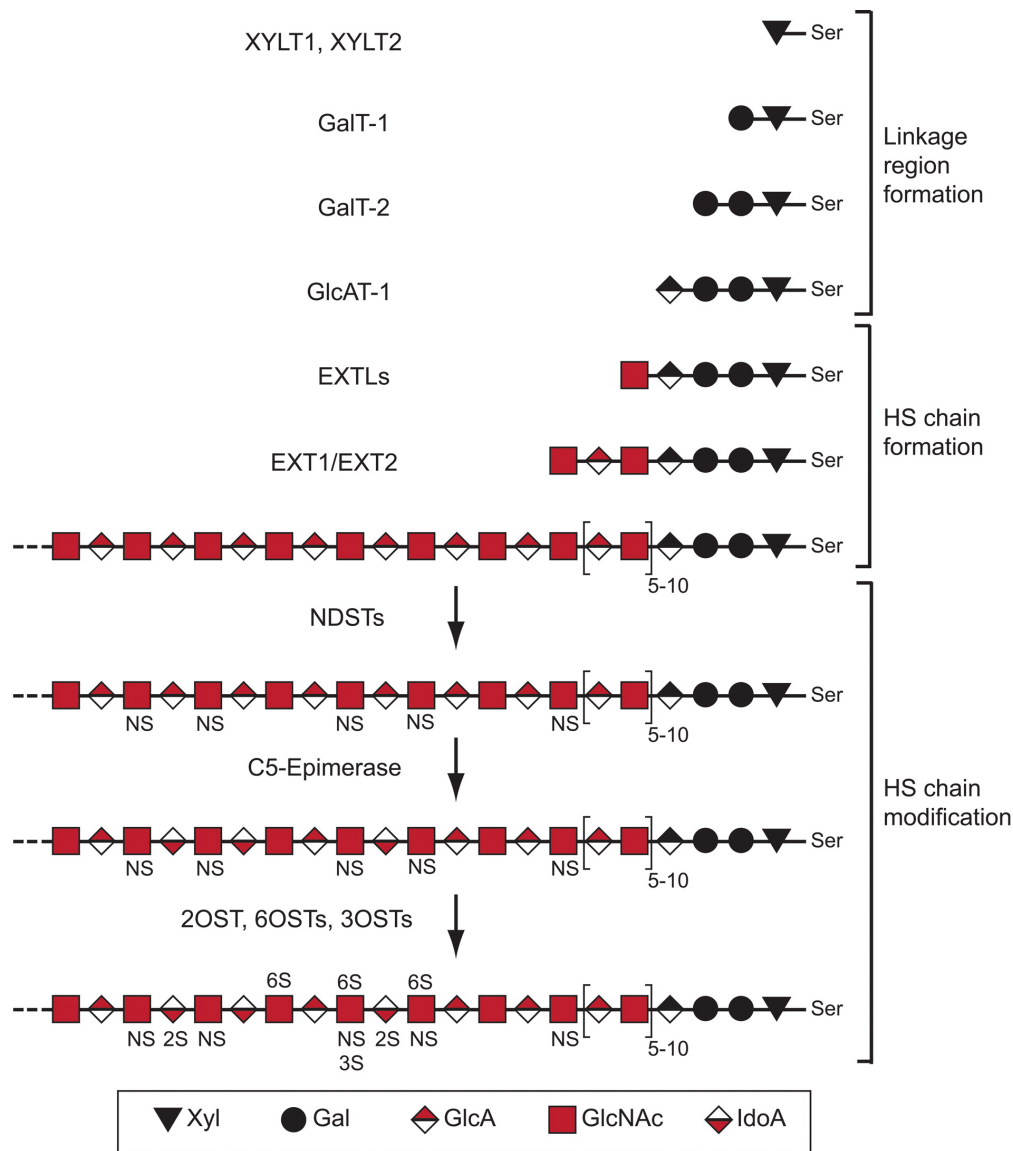


Figura 10. Esquema de la estructura y biosíntesis del HS. Se muestran de forma simplificada los pasos para la síntesis del HS y las enzimas implicadas. La estructura del HS es variable, por lo que se muestra un ejemplo aleatorio. Xyl= xilosa, Gal= galactosa, GlcA= ácido glucurónico, GlcNAc= N-acetilglucosamina, IdoA= ácido idurónico, NS= N-sulfatación, 6S= 6-O-sulfatación, 2S=2-O-sulfatación, 3S= 3-O-sulfatación y Ser= serina (Kreuger & Kjellén, 2012).

ciente en este gen ni se ha notificado ningún caso de mutaciones que causen enfermedad en humanos, por lo que su función *in vivo* aún no ha podido ser del todo esclarecida. Sin embargo, estos hechos podrían sugerir que la pérdida de función de EXTL1 es letal.

En lo que se refiere a la proteína EXTL2, ha demostrado tener dos actividades transferasas: puede transferir al tetrasacárido de unión tanto N-acetilglucosamina (actividad GlcNAc-TI) como N-acetilgalactosamina (actividad GalNAc-T) (Kitagawa et al, 1999; Okada et al, 2010), aunque solo se ha visto *in vitro* (Figura 11). El significado de su actividad GalNAc-T es difícil de entender ya que el producto no es un aceptor de otras glicosiltransferasas implicadas en la síntesis de GAGs. Por otro lado, la actividad GlcNAc-TI es clave para el inicio de la polimerización específica del HS, pero en el caso de EXTL2 esta actividad solo se ha detectado *in vitro* y de forma muy leve. De hecho, se ha visto que EXTL2 transfiere con mucha más eficiencia GalNAc que GlcNAc a un tetrasacárido de unión sintético (Kitagawa et al, 1999; Pedersen et al, 2003), por lo que su función podría ser diferente a la de iniciar la síntesis específica del HS.

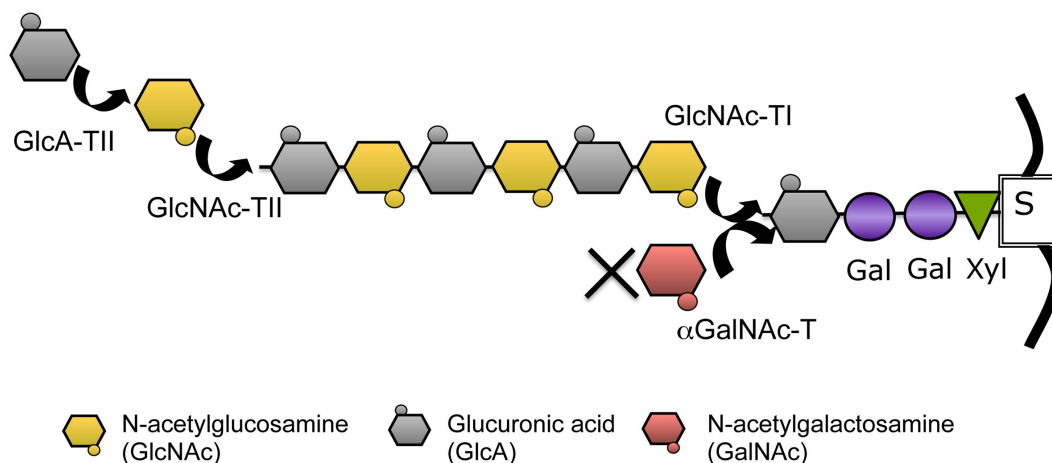


Figura 11. Esquema de las diferentes actividades glicosiltransferasas implicadas en la elongación de la cadena del HS. Una vez se ha añadido el tetrasacárido de unión a la Ser de la proteína central (derecha) actúa la primera glicosiltransferasa con actividad GlcNAc-TI para añadir la primera GlcNAc. A continuación, GlcA y GlcNAc son incorporadas de forma alterna por glicosiltransferasas con actividad GlcA-TII o GlcNAc-TII. Si en el tetrasacárido de unión, en vez de añadirse una GlcNAc, se añade GalNAc por transferasas con actividad GalNAc-T, la elongación de la cadena se verá interrumpida, aunque cabe destacar que esta actividad solo se ha detectado *in vitro* (Busse-Wicher et al, 2014).

Respecto a las posibles funciones de EXTL2, en un estudio en el que usaban fibroblastos de ratón deficientes en EXT1 se sugirió que EXTL2 era la enzima encargada de iniciar la elongación del HS con su actividad GlcNAc-TI, para que EXT2 siguiera con la elongación (Okada et al, 2010). Sin embargo, en otro trabajo propusieron que EXTL2 podría actuar como supresor de la síntesis de HS en el hígado de modelos de ratón, ya que vieron que la adición de GlcNAc por parte de EXTL2 a un tetrasacárido de unión que contenía una Xyl fosforilada impedía la elongación (Nadanaka et al, 2013b). Además, las células del hígado de los ratones deficientes en EXTL2 producían significativamente más HS durante su regeneración, aunque eran totalmente viables (Nadanaka et al, 2013a). En conjunto, todos estos estudios que intentan dilucidar la función de EXTL2 en la célula podrían indicar que el papel de EXTL2 es la regulación de la síntesis del HS específica de tipo celular. Cabe tener en cuenta también el estudio en los que mediante el uso de shRNAs se inhibe la expresión del gen *EXTL2* como aproximación terapéutica basada en SRT para el síndrome de Sanfilippo (Kaidonis et al, 2010). En estos estudios, tras esta inhibición se detectaba una reducción considerable del acúmulo de GAGs, lo cual indica la implicación de EXTL2 en su biosíntesis y no tanto en su inhibición. Se requerirá de estudios más específicos para resolver exactamente cuál es la función de esta proteína en la síntesis del HS (revisado en Busse-Wicher et al, 2014).

Por otro lado, la proteína EXTL3 tiene dos actividades glicosiltransferasas: puede transferir N-acetilglucosamina tanto al tetrasacárido de unión (GlcNAc-TI) como durante la elongación (GlcNAc-TII) (Figura 11), aunque esta última solo se ha detectado *in vitro* (Kim et al, 2001). En un estudio con células de mamíferos inhibieron mediante siRNAs la expresión de *EXTL3*, y esto dio lugar a cadenas mucho más largas de HS. Se dedujo que EXTL3 está principalmente implicada en la iniciación de la síntesis específica de HS, ya que tras su inhibición se reducen los sitios de inicio y las proteínas implicadas en la elongación de las cadenas siguen añadiendo residuos en las cadenas ya creadas, haciéndolas más largas (Busse et al, 2007). Otra opción para la presencia de estas cadenas de HS más largas sería la implicación de EXTL3 en la finalización de la elongación, aunque ningún otro

estudio refuerza esta opción. Sin embargo, sí se ha podido comprobar experimentalmente que el modelo murino deficiente en el gen *EXTL3* no es compatible con la vida por no poder generar HS (Takahashi et al, 2009), sugiriendo que esta enzima es clave en la iniciación de la síntesis del HS (Figura 10). Además, recientemente se han relacionado mutaciones en *EXTL3* con alteraciones neurológicas, del desarrollo, inmunitarias y esqueléticas (Oud et al, 2017; Volpi et al, 2017).

Las proteínas EXT1 y EXT2 son enzimas bifuncionales con capacidad de incorporar a la cadena de HS tanto ácido glucurónico (actividad GlcA-TII) como N-acetilglucosamina (actividad GlcNAc-TII) (Figura 11), por lo que están implicadas en la elongación de las cadenas de HS (Lind et al, 1998; McCormick et al, 2000; Senay et al, 2000) (Figura 10). Ambas enzimas son necesarias *in vivo* ya que se ha visto que la delección de cualquiera de los dos genes en modelos murinos no es compatible con la vida (Lin et al, 2000; Stickens et al, 2005). Además, en humanos las mutaciones en alguno de los alelos de los genes *EXT1* o *EXT2* dan lugar a exostosis múltiple, una enfermedad autosómica dominante caracterizada por deformidades óseas con riesgo de transformación maligna (revisado en Pacifici, 2017). Muy posiblemente, mutaciones en ambos alelos también sean incompatibles con la vida en humanos.

3.1.2. Degradación

La degradación de los proteoglicanos de HS se inicia en la matriz extracelular con la secreción de heparanasa y la posterior internalización de los restos, y acaba en el interior del lisosoma, donde actuarán diferentes enzimas (Figura 12) (Griffin & Gloster, 2017).

La heparanasa es una endoglucuronidasa que actúa tanto a nivel extracelular como intracelular y se encarga de los primeros pasos de la degradación de los proteoglicanos de HS, rompiendo las cadenas de HS en fragmentos más pequeños para facilitar los siguientes pasos en su procesamiento. Estos fragmentos más pequeños son transportados hasta el lisosoma mediante endocitosis, donde distintas enzimas llevarán a cabo la completa degradación del HS (Figura 12) (Griffin & Gloster, 2017).

Dado que son objeto de estudio en este trabajo cabe destacar, por un lado, la cuarta enzima implicada en esta degradación, llamada HGSNAT. Esta es la única enzima lisosomal que no es una hidrolasa, sino una acetilasa que toma el grupo acetil del acetil-CoA presente en el citoplasma y lo transfiere a la cadena del HS presente en el lumen lisosomal (Klein et al, 1978). Mutaciones en esta enzima dan lugar al síndrome de Sanfilippo tipo C. Por otro lado, tras la acetilación de la cadena de HS por parte de HGSNAT, la quinta enzima implicada en la degradación es NAGLU, cuya deficiencia causa el síndrome de Sanfilippo B. La enzima NAGLU se encarga de hidrolizar la N-acetilglucosamina terminal de la cadena del HS que se está degradando (O'Brien, 1972). Tres enzimas más han de actuar tras la acción de NAGLU para completar la degradación del HS, por lo que, si alguno de los pasos de esta cascada de acción falla, el HS no puede ser correctamente degradado y se llevará a cabo su acúmulo causando alguna de las enfermedades mostradas en la Figura 12.

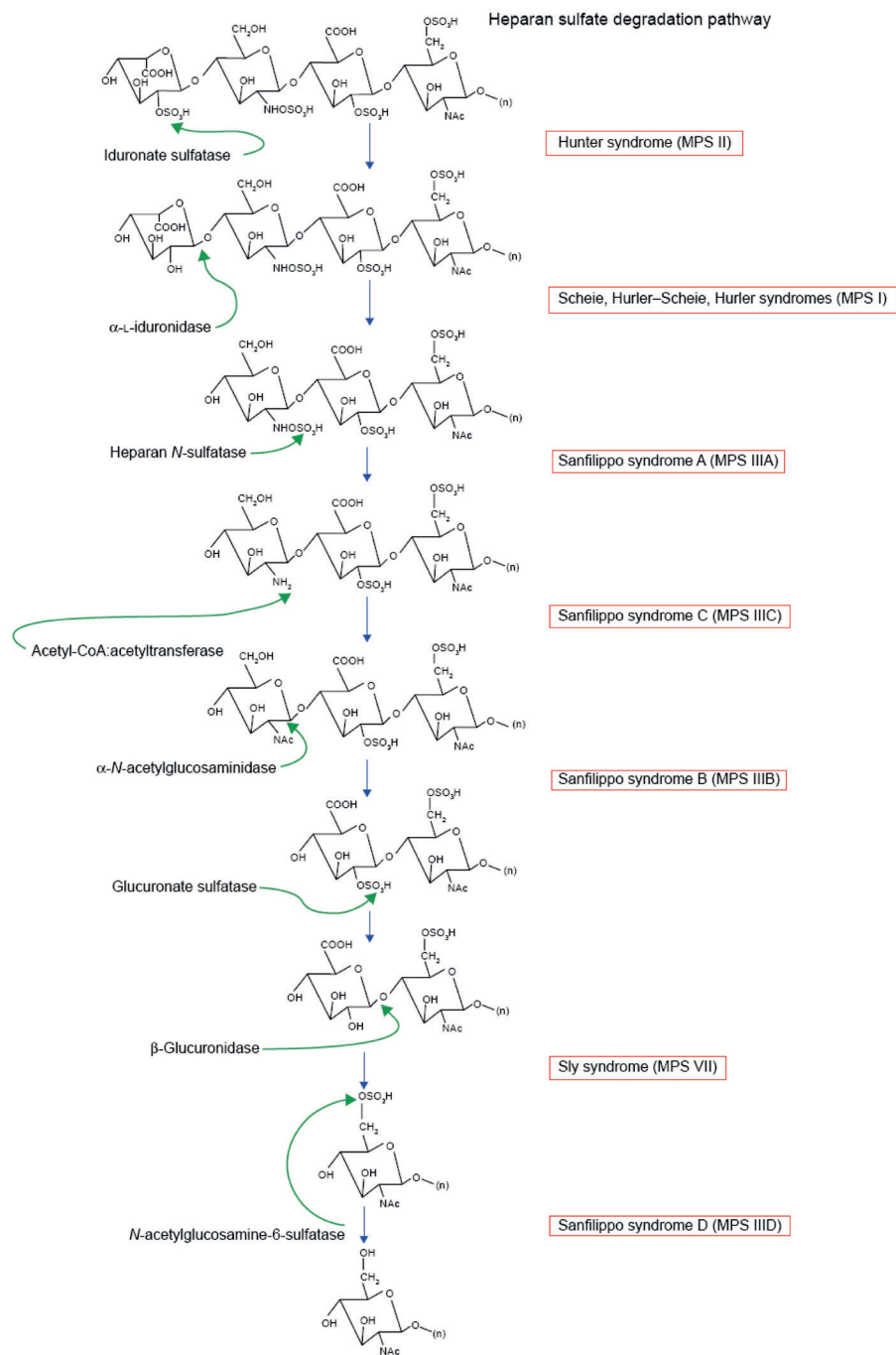


Figura 12. Pasos y enzimas implicadas en la degradación del HS en el lisosoma. En cuadros rojos se muestran las enfermedades asociadas a la deficiencia de la enzima implicada en ese paso de la degradación (Fenzl et al, 2015).

3.2. Clínica

El síndrome de Sanfilippo es una enfermedad multisistémica, pero con una considerable variabilidad clínica. La característica común y más destacable de este síndrome es la degeneración progresiva que sufre el CNS desde los primeros años de vida de los pacientes. Las manifestaciones somáticas también se encuentran presentes en los individuos con Sanfilippo, pero son comparativamente menos agresivas clínicamente (Wagner & Northrup, 2019).

Aunque la afectación que sufre el CNS es el síntoma clínico más característico de esta enfermedad, el desarrollo temprano de estos pacientes suele ser relativamente normal. Los

síntomas neurológicos aparecen entre los 2 y los 6 años de edad y el desarrollo se ve estancado dando paso a un progresivo deterioro motor y cognitivo. Por ejemplo, si el paciente había aprendido a hablar, esta capacidad irá degenerando hasta su total pérdida entre los diez y quince años (Wagner & Northrup, 2019). Características como hiperactividad, comportamiento agresivo o problemas de sueño acompañan a este profundo retraso mental, y todas ellas se agravan progresivamente hasta la muerte de los pacientes (Valstar et al, 2008). Este deterioro del CNS también va acompañado de afectaciones somáticas leves, como excesivo vello (hirsutismo), piel dura y gruesa, hepatoesplenomegalia leve, rigidez articular, disfagia (dificultad al tragar), hipoacusia grave y, en algunos casos, diarrea. Las infecciones del tracto respiratorio son comunes debido a una respiración anormal consecuencia de la neurodegeneración y un drenaje ineficiente. Muchos individuos presentan también afectaciones esqueléticas leves, como escoliosis, dolicocefalia (cráneo estrecho), macrocefalia, o rasgos faciales gruesos que se hacen más evidentes conforme los GAGs se acumulan en los tejidos. Otros dismorfismos pueden incluir un engrosamiento de alas nasales o los labios, así como de las orejas o la lengua (macroglotia) (Neufeld & Muenzer, 2001; Wagner & Northrup, 2019). El aspecto típico de pacientes de Sanfilippo se puede ver en la Figura 13.



Figura 13. Pacientes de Sanfilippo A (izquierda) y Sanfilippo B (derecha). Ambas pacientes tienen 7 años, y en el momento de la imagen muchos de los síntomas somáticos característicos de la enfermedad eran ya visibles, y el deterioro cognitivo era cada vez más evidente. (Neufeld & Muenzer, 2001).

Los distintos subtipos de Sanfilippo muestran síntomas muy similares, pero la severidad clínica de cada paciente es muy variable, no solo entre los distintos subtipos sino también entre miembros de una misma familia (Berger-Plantinga et al, 2004; Valstar et al, 2010; Verhoeven et al, 2010). Típicamente se ha descrito a los individuos con Sanfilippo A como los que tienen una progresión más rápida y severa de la enfermedad, aunque actualmente los pacientes de Sanfilippo en global se clasifican en casos severos, intermedios o atenuados, dependiendo de la severidad de sus síntomas (Valstar et al, 2010).

La esperanza de vida de estos enfermos se encuentra considerablemente reducida en comparación a la población sana. Suelen morir entre la segunda y la tercera década de vida debido a sus problemas neurológicos o, en muchos casos, a infecciones del tracto respiratorio (Lavery et al, 2017). Excepcionalmente, individuos que presentan una progresión más lenta de la enfermedad pueden llegar a vivir más años (Verhoeven et al, 2010).

3.3. Genética

En la Tabla 2 se puede ver un resumen de los distintos subtipos del síndrome de Sanfilippo incluyendo la enzima deficitaria en la enfermedad, el gen causante y su localización

en el genoma, así como el número de mutaciones conocidas en ese gen y la prevalencia de cada subtipo. A continuación, se incluye con más detalle la descripción genética y molecular de los subtipos B y C del síndrome, que son objeto de estudio de este trabajo.

3.3.1. Subtipo B

El síndrome de Sanfilippo tipo B o MPS IIIB (OMIM #252920) está causado por mutaciones en el gen *NAGLU*, que codifica la α -N-acetilglucosaminidasa (*NAGLU*, EC:3.2.1.50), una enzima lisosomal que se encarga de uno de los pasos de la degradación del HS. La incidencia en Europa de este subtipo de Sanfilippo va desde 0 a 0,71 casos cada 100.000 nacidos vivos según el país, siendo el segundo subtipo más frecuente tras el A (Zeilei et al, 2018).

El gen *NAGLU* está situado en el cromosoma 17q21.2 (Zhao et al, 1996) y tiene 6 exones en sus 8,21 Kb (Figura 14). Hasta el momento se han descrito 171 mutaciones en este gen, causantes del síndrome de Sanfilippo B (HGMD® Professional 2019.4). La mayoría de las mutaciones descritas son de cambio de sentido (*missense*), pero también hay casos de mutaciones sin sentido (*nonsense*), deleciones, inserciones o mutaciones de *splicing*. Las frecuencias alélicas de las distintas mutaciones son muy bajas, por lo que la mayoría de mutaciones son únicas para cada familia. La heterogeneidad alélica contribuye a la gran variabilidad clínica del síndrome de Sanfilippo B (Valstar et al, 2008). La existencia de numerosos polimorfismos que pueden modificar la severidad de la enfermedad dificulta la predicción del fenotipo en base al genotipo, aunque se cree que mutaciones como p.F48L, p.G69S, p.S612G y p.R643C están más asociadas con casos menos graves (Yogalingam & Hopwood, 2001). Incluso se ha visto cierta correlación entre mutaciones *missense* y fenotipos atenuados, en comparación con mutaciones *nonsense* que se asocian más a fenotipos severos (Moog et al, 2007).



Figura 14. Estructura del gen *NAGLU*, con 8,21 Kb de longitud y 6 exones (www.ensembl.org).

La enzima *NAGLU* (O'Brien, 1972) se encarga de la hidrólisis del enlace entre la N-acetilglucosamina y el ácido urónico, dos sacáridos en el extremo del HS (Figura 15A). Es un enzima con 720 aminoácidos, 6 posibles sitios de N-glicosilación (N261, N272, N435, N503, N526 y N532), y tres dominios estructurales diferenciados (Figura 15B). Se ha visto que tiene tendencia a oligomerizar formando homotrímeros simétricos que se mantienen principalmente por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. En estos homotrímeros, el sitio catalítico, en el que destacan dos glutamatos (E316 y E446), queda mirando hacia afuera del eje de simetría (Birrane et al, 2019).

Hasta el momento ha sido generado un modelo de ratón del síndrome de Sanfilippo B, que fue obtenido mediante la disrupción del exón 6 del gen ortólogo *Naglu* y mostraba sintomatología similar a la presentada en la enfermedad humana, como acúmulo de HS en diferentes tejidos, acumulación secundaria de gangliósidos, vacuolización en diferentes

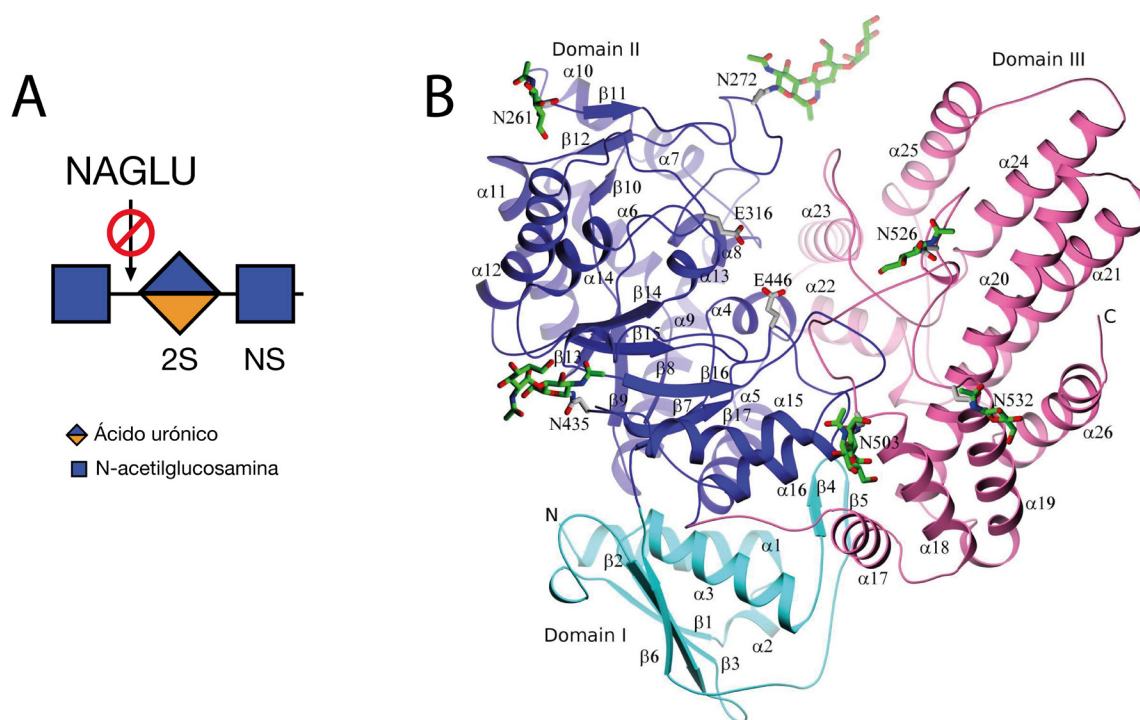


Figura 15. Descripción de la enzima NAGLU. (A) Esquema de la reacción enzimática llevada a cabo por la enzima NAGLU, que hidroliza el enlace que une la N-acetilglucosamina con el ácido urónico en el extremo terminal del HS. S= sulfato, N= cualquier sustituyente (hidrógeno, acetato, etc.) (adaptado de Lawrence et al, 2012). (B) Estructura terciaria de los monómeros de NAGLU, con los 3 dominios. El dominio I (cyan) está localizado bajo el bolsillo catalítico con dos hojas β insertadas entre el dominio catalítico II (morado) y el dominio III de hélices α (rosa). Los glutamatos catalíticos E316 y E446 y las glicosilaciones se muestran en gris y verde, respectivamente. Se han omitido 310 hélices para una mayor claridad (Birrane et al, 2019).

tipos celulares, pérdida de audición y menor esperanza de vida (Li et al, 1999). Por otro lado, también se han descrito otros casos de modelos animales naturales para el síndrome de Sanfilippo B, como perros Schipperke que sufrían de temblores y tropiezos continuos y que al analizarlos con detenimiento manifestaron un profundo deterioro neurológico causado por deficiencia en la enzima Naglu (Ellinwood et al, 2003; Raj et al, 2020). Otro caso de aparición natural fue en dos emús (*Dromaius novaehollandiae*) que mostraban también deterioro motor, baja actividad de Naglu y acúmulo de HS en diferentes tejidos. A este modelo aviar se le realizó un diagnóstico molecular detectando una delección de 2 pares de bases en el exón 6 (c.1098-1099delGG) (Aronovich et al, 2001). Cabe destacar que, aunque los modelos animales descritos muestran alteraciones del CNS, no presentan neurodegeneración similar a la de los humanos, un fenotipo crucial.

3.3.2. Subtipo C

El síndrome de Sanfilippo tipo C o MPS IIIC (OMIM #252930) está causado por mutaciones en el gen *HGSNAT*, que codifica la heparán- α -glucosaminido N-acetiltransferasa (HGSNAT, EC:2.3.1.78), una enzima transmembrana lisosomal que se encarga de uno de los pasos de la degradación del HS. La incidencia en Europa de este subtipo va desde 0 a 0,34 casos cada 100.000 nacidos vivos según el país, y es el tercer subtipo más frecuente, tras el A y el B (Zeilei et al, 2018).

El gen *HGSNAT* está situado en 8p11.21 (Fan et al, 2006; Hřebíček et al, 2006) y contiene 18 exones en sus 62,39 Kb (Figura 16). Hasta el momento se han descrito 71

mutaciones causantes de este síndrome (HGMD® Professional 2019.4), siendo el 40% del total las *missense*, y el 36% las de *splicing* y las *nonsense*, aunque también hay descritas algunas deleciones, inserciones, indels y reordenamientos complejos. Aunque la incidencia de este síndrome es muy baja, según la población estudiada sí que se han descrito ciertas mutaciones que son más prevalentes, como la c.852-1G>A que representa un 30% de los alelos causantes de Sanfilippo C en Italia (Fedele et al, 2007), la c.525dupT que es la mutación predominante en Portugal (62.5% de los alelos) (Coutinho et al, 2008), o la p.R344C (22%) y la p.S518F (29.3%) que se encuentran con más frecuencia en Holanda (Ruijter et al, 2008). La mutación c.372-2A>G se encontró en cuatro pacientes españoles, así como la mutación c.234+1G>A, que se encontró en una familia española y otra marroquí (Canals et al, 2011), y posteriormente en dos pacientes turcos, hipotetizando así un origen peri-mediterráneo de la mutación (Ouesleti et al, 2017). No se han establecido relaciones entre el genotipo y el fenotipo, aunque probablemente las mutaciones p.G262R y p.S539C se asocien con fenotipos más atenuados y de aparición más tardía (Ruijter et al, 2008).



Figura 16. Estructura del gen *HGSNAT*, con 62,39 Kb de longitud y 18 exones (www.ensembl.org).

La enzima HGSNAT (Klein et al, 1978) cataliza la acetilación de los residuos de glucosamina terminales del HS (Figura 17A), antes de su hidrólisis por parte de la enzima NAGLU. Es una enzima con 635 aminoácidos y 11 dominios transmembrana. Los 42 aminoácidos del N-terminal forman un péptido señal para promover su integración en la membrana como un único precursor de 62 KDa que de forma postraduccional se separará en una cadena α de 27 KDa, dos sitios de glicosilación y ningún segmento transmembrana, y una cadena β de 44 KDa, tres sitios de glicosilación y los 11 segmentos transmembrana. El primer loop citosólico contiene una señal de localización intracelular para su integración en la membrana lisosomal (ETDRLI209) (Figura 17B y 17C) (Fan et al, 2011; Fedele et al, 2018). Poco se conoce acerca de qué proteínas lisosomales interaccionan con HGSNAT para su correcto transporte y función. Sin embargo, en un estudio reciente se ha demostrado la interacción de HGSNAT con ALIX, una proteína relacionada con el transporte vesicular, demostrando también la presencia de HGSNAT en exosomas (Figura 17B) (Fedele et al, 2018).

En el caso del síndrome de Sanfilippo C no se ha descrito ningún modelo natural hasta el momento, pero recientemente sí que se han generado dos modelos murinos para esta enfermedad. El primero se obtuvo mediante inactivación del gen *Hgsnat* en la línea germinal. Los ratones resultantes manifestaban reducción de su memoria, problemas al caminar y retención urinaria; también se observó acúmulo de HS en diferentes tejidos, así como disfunción energética en el CNS por problemas en las mitocondrias (Martins et al, 2015). Por otro lado, se generó otro nuevo modelo en el que se interrumpía el gen *Hgsnat* de forma dirigida y, mediante la incorporación del gen LacZ detrás de su promotor, se estudió su expresión. Se comprobó que *Hgsnat* se expresa principalmente en el CNS, pero también en otros órganos periféricos. En el modelo se detectaron síntomas típicos de la en-

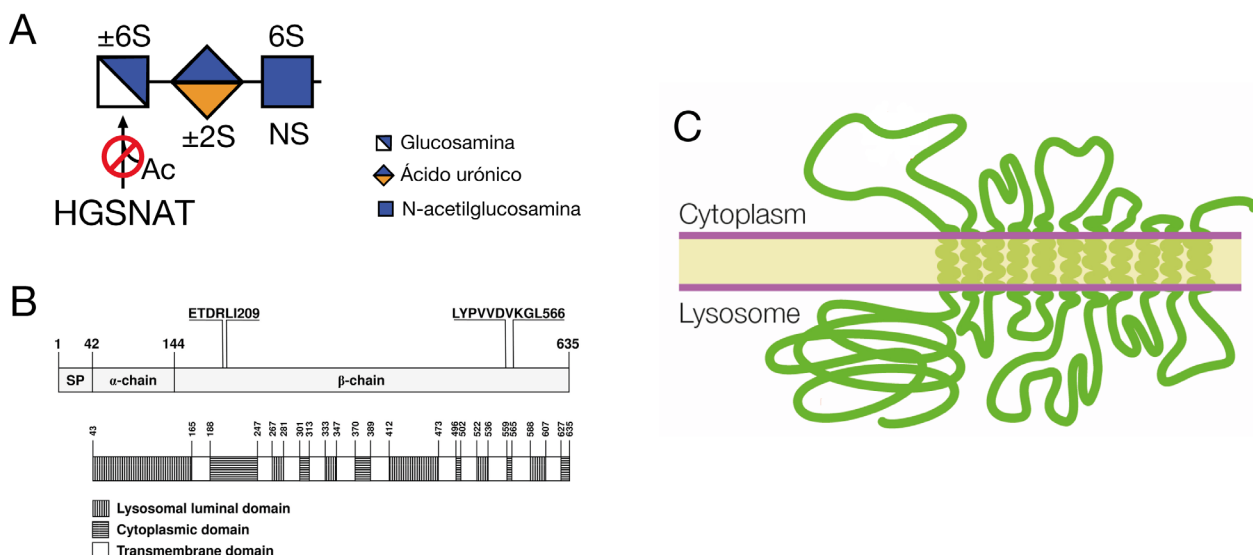


Figura 17. Descripción de la enzima HGSNAT. (A) Esquema de la reacción enzimática llevada a cabo por la enzima HGSNAT, en la que acetila los residuos de glucosamina terminales del HS. S= sulfato, N= cualquier sustituyente (hidrógeno, acetato, etc.) (adaptado de Lawrence et al, 2012). (B) Alineamiento esquemático de HGSNAT, en el que arriba se muestra la localización del péptido señal (SP), la cadena α , la cadena β , la secuencia para la integración en la membrana lisosomal (ETDRLI209), y la supuesta secuencia de unión ALIX para su localización en vesículas extracelulares (LYPVVDVKGL566); abajo se muestra la distribución de los dominios del lumen lisosomal, transmembrana, o del citoplasma (Fedele et al, 2018). (C) Representación esquemática de la enzima HGSNAT en base a la distribución de sus distintos dominios.

fermedad de humanos, como acumulación de GAGs, distensión y disfunción lisosomal, así como neuroinflamación, alteraciones en el sistema motor y una reducción en la esperanza de vida (Marcó et al, 2016). Sin embargo, como pasaba con los modelos animales para el síndrome de Sanfilippo B, en ningún caso se ha descrito que estos ratones presenten una neurodegeneración similar a la de los humanos.

3.4. Diagnóstico

El diagnóstico de un caso del síndrome de Sanfilippo en una familia sin antecedentes suele empezar en el momento que hay sospechas clínicas, y esto no siempre es rápido ya que, como se ha mencionado anteriormente, la aparición de los síntomas es entre los 2 y los 6 años y, al ser una enfermedad poco frecuente, es difícil encontrar un clínico familiarizado con ellos.

Como norma general, cualquier niño entre 6 meses y 10 años que sufra un primer periodo de desarrollo normal pero que llegado cierto momento se estanque y estas habilidades previamente adquiridas se vayan perdiendo, se debería considerar un posible caso de LSD (Platt et al, 2018). Tras esta primera sospecha, las pruebas diagnósticas deben ir dirigidas hacia el grupo de trastornos que presentan síntomas clínicos similares al del paciente que está siendo evaluado.

En el caso de que haya sospecha de MPS, el diagnóstico suele empezar con un análisis de los niveles de GAGs en orina. El método más frecuente para realizar esta medida es el del *1,9-dimethylmethylene blue* (DMMB). Este compuesto se une a los GAGs de la orina y luego se puede cuantificar el complejo por espectrofotometría a 520 nm (Barbosa et al, 2003). Cualquier aumento en los niveles normales de GAGs confirmará que se trata de una MPS, pero se deberá hacer un análisis más detallado para saber qué GAGs se

están acumulando. Para ello, existen opciones como la electroforesis de acetato de celulosa de alta resolución, que permite separar e identificar los GAGs presentes en muestras de orina, o también el uso de geles de poliacrilamida. La presencia mayoritaria de HS como GAG acumulado enfocará el diagnóstico hacia el síndrome de Sanfilippo (Fedele et al, 2015), sin indicar el subtipo específico de la enfermedad. El diagnóstico definitivo normalmente se obtiene tras el análisis de actividad enzimática de las diferentes enzimas relacionadas con el síndrome de Sanfilippo, bien en plasma, leucocitos o fibroblastos. Los niveles de actividad se expresan como cantidad de sustrato procesado por miligramo de proteína total por unidad de tiempo, y siempre se comparan con una muestra control. Los niveles de actividad de la enzima deficiente son siempre inferiores al 15% en comparación a la del control (Andrade et al, 2015; Platt et al, 2018).

Sin embargo, en la actualidad se están desarrollando métodos basados en la espectrometría de masas en tándem (también conocida como MS / MS) para la identificación de oligosacáridos específicos que se acumulan como resultado de una deficiencia enzimática específica (Oguma et al, 2007). El estudio más reciente al respecto combina la cromatografía líquida con la MS / MS para analizar la naturaleza única del residuo final no reductor del GAG acumulado ante la deficiencia de una enzima particular en la ruta (Figura 18) (Lawrence et al, 2012).

Tras tener la información acerca de cuál es la enzima deficiente en el paciente, se puede realizar un diagnóstico genético basado en el análisis de DNA para obtener información acerca de la mutación causante. El análisis clásicamente se ha llevado a cabo mediante el diseño de oligonucleótidos *primers* que permitan la amplificación de exones y regiones flanqueantes usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) sobre DNA genómico. Los productos se secuencian posteriormente y se comparan con una secuencia control. El reciente desarrollo de las tecnologías de *next-generation sequencing* permite la identificación de nuevas variantes genéticas de importancia incierta, y también podría expandir el fenotipo clínico de las LSDs individuales a medida que se describen nuevas variantes genéticas (Platt et al, 2018). El análisis mu-

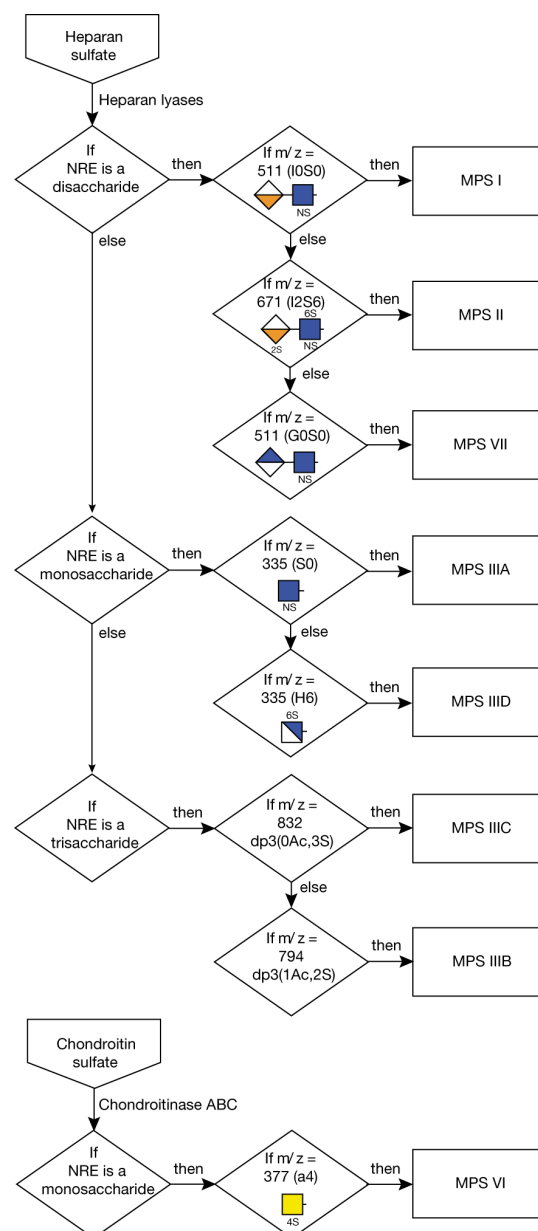


Figura 18. Diagrama para el diagnóstico sistemático de MPSs. Se analizan los glicanos de los finales no reductores (NRE) de los GAGs de la muestra analizada. El criterio de detección se basa en el tamaño de los NRE, el valor m/z (masa entre carga), y aspectos estructurales (número de acetatos (Ac) o sulfatos (S)) (Lawrence et al, 2012).

tacional no solo confirma el diagnóstico enzimático, si no que permite realizar análisis de portadores y diagnósticos prenatales o preimplantacionales.

El diagnóstico prenatal se realiza en familias donde hay un hijo o pariente cercano afectado. Es posible realizarlo a partir de líquido amniótico o vellosidades coriónicas, y puede ser genético o enzimático, pero debido a las decisiones que deben ser tomadas se suelen realizar ambos análisis. Además, la cantidad de HS también puede ser medida a partir del líquido amniótico (Andrade et al, 2015). En lo que se refiere a *screening* neonatal, no se ha implantado para el síndrome de Sanfilippo ya que no existe actualmente ninguna terapia efectiva para tratar la enfermedad.

3.5. Tratamiento para el síndrome de Sanfilippo

Hasta el momento, el tratamiento para los pacientes de Sanfilippo se basa principalmente en medidas paliativas. En el apartado 2.1 se expuso el estado actual de las principales terapias existentes para las distintas LSDs. En el apartado siguiente se expondrá el estado actual de las estrategias terapéuticas desarrolladas específicamente para el síndrome de Sanfilippo.

3.5.1. Terapia génica en el síndrome de Sanfilippo

La terapia génica es una estrategia muy ventajosa para tratar las MPSs, ya que se ha sugerido que recuperando el 5-15% de la actividad enzimática el estado clínico de los pacientes ya mejora considerablemente (Figura 4) (Parenti et al, 2015b). Para el síndrome de Sanfilippo, una enfermedad con implicación neurológica, el uso de AAV parece ser una buena estrategia ya que se ha visto que algunos serotipos son capaces de transducir tanto células que se dividen como aquellas que no, además de que pueden tener una expresión a largo plazo en el organismo y pueden atravesar la BBB por transcitosis mediada por receptor (Fu & McCarty, 2016).

Como se comentó en el apartado 2.1.1, la terapia génica se está evaluando en ensayos clínicos para Sanfilippo A y B mediante inyección intracerebral (NCT01474343; NCT03300453), y los resultados publicados hasta el momento muestran avances positivos (Tardieu et al, 2017; Tardieu et al, 2014). En el caso de Sanfilippo A, se ha iniciado recientemente otra fase del ensayo clínico (NCT03612869) para explorar más en profundidad los beneficios de esta estrategia, y se esperan los primeros resultados en pocos años.

Por otro lado, la terapia génica mediante inyección intravenosa mostró beneficios en el CNS usada en modelos murinos de los subtipos A y B de la enfermedad (Duncan et al, 2015; Naughton et al, 2013; Ruzo et al, 2012), por lo que actualmente esta estrategia está siendo probada en pacientes. Actualmente, hay ensayos clínicos en funcionamiento tanto para Sanfilippo A como B (NCT02716246; NCT04088734; NCT03315182). Abeona Therapeutics, la farmacéutica encargada del ensayo clínico del subtipo A, ha comunicado recientemente que los resultados preliminares del estudio demuestran que, en los pacientes tratados a edades más tempranas y con la dosis más elevada del producto (ABO-102), la preservación del desarrollo neurocognitivo se mantiene 12-18 meses postratamiento, y

las mejoras en muchos otros biomarcadores de la enfermedad parecen evidenciar un claro efecto beneficioso del tratamiento.

En cuanto al subtipo C, no es por lo general un buen candidato para esta aproximación terapéutica debido a que la enzima afectada es transmembrana y se requiere que el vector llegue a cada una de las células afectadas para conseguir así una distribución global de la enzima. Un nuevo AAV, llamado AAV-TT, ha demostrado una mejor distribución en el CNS en comparación a otros AAVs como AAV9 o AAVrh10, además de un fuerte neurotropismo en modelos de ratón. Este AAV-TT administrado a bajas dosis en el modelo de ratón del síndrome de Sanfilippo C ha sido capaz de corregir los fenotipos neurológicos, sugiriendo una transducción más amplia y eficiente de las células neurales (Tordo et al, 2018).

3.5.2. Chaperonas farmacológicas en el síndrome de Sanfilippo

En cuanto a las chaperonas farmacológicas, hay que tener en cuenta que solo las mutaciones *missense* son candidatas a responder a esta terapia. Como ya se ha mencionado, algunas LSDs se pueden beneficiar de esta estrategia terapéutica. Sin embargo, para el síndrome de Sanfilippo solo un ensayo preclínico con fibroblastos de paciente de Sanfilippo C mostró un incremento de 2,5 veces en la actividad enzimática de HGSNAT tras el uso de una molécula llamada glucosamina (Feldhammer et al, 2009). También para el subtipo B se han propuesto varias moléculas que a dosis bajas podrían actuar como chaperonas, pero están en fase experimental inicial (De Ruijter et al, 2011; Ficko-Blean et al, 2008; Zhao & Neufeld, 2000).

3.5.3. Reemplazamiento enzimático en el síndrome de Sanfilippo

La investigación sobre la terapia de reemplazamiento enzimático en el síndrome de Sanfilippo se basa principalmente en mejorar la llegada de la enzima al CNS.

En el síndrome de Sanfilippo A, resultados positivos con primates y células al usar una proteína recombinante de la enzima SGSH fusionada a un anticuerpo (Boado et al, 2014), dio pie a ensayos clínicos. Para evitar la BBB y permitir repetidas administraciones de la enzima, se ha probado de implantar de forma permanente un dispositivo de liberación de fármacos en el espacio intratecal de los pacientes de Sanfilippo A (NCT01155778; NCT01299727; NCT02060526; NCT02350816). En los resultados publicados de estos estudios se ha podido ver que este tipo de administración parece ser segura y tolerable en algunos casos, pero la droga administrada no ha resultado lo eficiente que se esperaba. Aunque se ha demostrado la existencia de un descenso en el acúmulo de HS, no se ha manifestado ninguna mejora neurocognitiva en los pacientes, por lo que los resultados deben ser interpretados con cautela (Jones et al, 2016; Wijburg et al, 2019).

Para Sanfilippo B, experimentos previos con el modelo murino de la enfermedad demostraron que la administración intracerebroventricular de una proteína quimérica, que combina la enzima NAGLU y una forma truncada del factor de crecimiento insulina-*like* 2 humano, podría ser una buena estrategia terapéutica (Kan et al, 2014). Por ello se inició un ensayo clínico (NCT02754076; NCT03784287), y los resultados preliminares se han publi-

cado recientemente. En ellos se destaca que los niveles de HS en el líquido cerebroespinal vuelven a niveles normales tras pocas semanas de tratamiento, y que la mayoría de pacientes presentan una estabilización en el cociente de desarrollo al cabo de pocos meses. Otros síntomas somáticos también presentan mejoras tras el tratamiento y en general parece que la administración intracerebroventricular se tolera correctamente. Sin embargo, es necesario un seguimiento a largo plazo (Cleary et al, 2019).

3.5.4. Terapia de células madre en el síndrome de Sanfilippo

Actualmente no existe ningún tratamiento basado en células madre para el síndrome de Sanfilippo, ya que tras realizar distintos experimentos infructíferos en pacientes se ha comprobado que tanto el trasplante de médula ósea como el de células madre hematopoyéticas no resultan efectivos en el tratamiento de este síndrome, principalmente en lo que se refiere a frenar el declive cognitivo, incluso cuando se aplica el tratamiento en pacientes menores de 2 años en los que aún no se ha manifestado el deterioro del CNS (Gaffke et al, 2018; Sawamoto et al, 2019).

Sin embargo, en modelos animales se han publicado algunos estudios que podrían arrojar luz acerca de posibles estrategias para aplicar la terapia de células madre en el síndrome de Sanfilippo. En el modelo de ratón para el síndrome de Sanfilippo B se administraron mensualmente de forma intravenosa células mononucleares de cordón umbilical humano, y tras seis meses de tratamiento se detectó una reducción en la activación de la microglía y en el acúmulo cerebral de gangliósidos, así como un restablecimiento de la arquitectura del hipocampo (Willing et al, 2014). También para Sanfilippo B, más recientemente, el trasplante de células madre hematopoyéticas, que tras someterse a terapia génica *ex vivo* expresaban *NAGLU*, normalizó los niveles de HS y de expresión de citoquinas inflamatorias en el cerebro, y también mostró mejoras en el comportamiento del animal (Holley et al, 2018). En cuanto al modelo animal de Sanfilippo A, también se mostraron mejoras en el CNS cuando se realizó el trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas transducidas para sobreexpresar el gen deficiente (Ellison et al, 2019; Langford-Smith et al, 2012; Sergijenko et al, 2013). Las células derivadas de estos trasplantes autólogos son capaces de cruzar la BBB y llegar al cerebro de los animales, desde donde liberan la proteína terapéutica al CNS. Pronto será iniciado un ensayo clínico en pacientes de Sanfilippo A (<https://www.orchard-tx.com/>).

3.5.5. Terapia de reducción de sustrato en el síndrome de Sanfilippo

Diferentes moléculas han sido estudiadas como candidatas a tratar el síndrome de Sanfilippo mediante terapia de reducción de sustrato (SRT).

La rodamina B inhibe de forma inespecífica la elongación de la cadena de GAGs. Al tratar ratones modelo de Sanfilippo A con este compuesto se redujo el acúmulo de GAGs en distintos tejidos, incluyendo cerebro, y también estos ratones mejoraron su memoria y percepción espacial (Roberts et al, 2007; Roberts et al, 2006). Posteriormente, se estudió el efecto de la rodamina B a lo largo de 4 generaciones de este modelo animal, demostrando que una larga exposición a bajas dosis no produce alteraciones, tampoco durante el embarazo (Roberts et al, 2010). Sin embargo, tanto el mecanismo de acción de esta molécula

como su posible toxicidad deberían ser estudiados más en profundidad antes de aplicarse a nivel clínico (Sohn, 2018), ya que se describió que exposiciones agudas a este compuesto en humanos dan lugar a irritaciones en la piel y la mucosa (Dire & Wilkinson, 1987).

La genisteína es una isoflavona que, obtenida de la planta de la soja, inhibe la actividad tirosina-proteína quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, que es necesaria para la expresión de genes relacionados con la producción de GAGs (Jakóbkiewicz-Banecka et al, 2009; Piotrowska et al, 2006). Tras tratar con esta molécula ratones modelo de Sanfilippo B se observó una reducción de los GAGs acumulados en diferentes órganos, incluyendo el cerebro, así como una mejora en la inflamación neuronal y en los problemas de comportamiento previamente descritos (Malinowska et al, 2009; Malinowska et al, 2010). Por otro lado, se realizó también un estudio con 10 pacientes de Sanfilippo A y B, que recibieron el compuesto de forma oral, y tras el primer año de tratamiento se apreció un descenso en la acumulación de GAGs y una mejora en la función cognitiva sin efectos secundarios apreciables (Piotrowska et al, 2008). Se realizó un seguimiento durante dos años más de 8 de los pacientes, y hubo casos en los que los problemas cognitivos siguieron sin aparecer significativamente, mientras que en otros simplemente se había ralentizado su aparición (Piotrowska et al, 2011). En otro ensayo clínico se vio una clara reducción de los GAGs en orina, pero no se apreció una mejora clara a nivel neurológico (Delgadillo et al, 2011; De Ruijter et al, 2012). Recientemente se ha demostrado que la genisteína también promueve la expresión de genes de hidrolasas de GAGs, y estimula la función y biosíntesis lisosomal mediante la modulación de la expresión y actividad de TFEB (Moskot et al, 2014). En otro ensayo clínico se evaluó la seguridad de altas dosis de genisteína en pacientes de MPSs, y no se detectaron efectos secundarios destacables, aunque tampoco mayores beneficios (Kim et al, 2013). Para llegar a conclusiones más significativas acerca de su seguridad y eficacia se requería de un ensayo clínico a mayor escala. Por ello, se inició en 2014 un ensayo clínico aleatorizado controlado con placebo, con pacientes de entre 2 y 15 años de Sanfilippo A, B y C (EudraCT 2013-001479-18), pero aún no se han publicado los resultados. La genisteína parece tener cierto potencial como posible SRT para el síndrome de Sanfilippo y, posiblemente, para otras LSDs (Coutinho et al, 2016a; Wegrzyn et al, 2010).

El Miglustat es un fármaco ya aprobado para el tratamiento de Gaucher tipo 1 y Niemann-Pick C, ya que es un inhibidor de la glucosilceramida sintasa. Se esperaba que este fármaco inhibiera la síntesis de glucosilceramida, un precursor del gangliósido GM2, y que con ello se redujera la degeneración neurológica de distintas MPSs. Sin embargo, en ensayos clínicos con pacientes del síndrome de Sanfilippo no se observó reducción de este gangliósido ni tampoco ninguna mejora a nivel neurológico (Guffon et al, 2011).

A parte de las pequeñas moléculas con propiedades inhibitorias, el uso de RNA de interferencia (RNAi) para inhibir de forma postranscripcional genes de enzimas biosintéticas también se ha planteado como posible SRT.

3.5.5.1. RNAi como SRT

Los experimentos en los que se ha usado RNAi como SRT son escasos, pero con resultados prometedores. En un primer trabajo se usaron fibroblastos de pacientes de Sanfilippo A para probar un tratamiento basado en siRNAs que inhibía los genes *XYLT1*, *XYLT2*,

GALT1 y *GALT2*, que daban lugar a enzimas relacionadas con la síntesis de GAGs. Pasadas 48h de la transfección de los siRNAs correspondientes, los niveles de mRNA de cada gen se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real, obteniendo una reducción de aproximadamente el 75% en los mRNAs de los genes inhibidos, que también se correlacionaba con una reducción de las proteínas respectivas y la síntesis de GAGs en general (Dziedzic et al, 2010).

Casi al mismo tiempo se publicó otro estudio en el que se usaban shRNAs en fibroblastos de Sanfilippo A para inhibir la expresión de genes de enzimas específicas de la biosíntesis de HS, los genes *EXTL2* y *EXTL3*. Los mejores resultados se obtuvieron con shRNAs contra el gen *EXTL2*, obteniendo hasta un 68% de inhibición en su expresión, y un 50% de reducción en la síntesis de GAGs (Kaidonis et al, 2010).

Sin embargo, todos estos estudios se han llevado a cabo en tipos celulares muy distintos de aquellos que sufren un mayor deterioro en el síndrome de Sanfilippo, como son las células del CNS. Estudios más específicos son necesarios para probar si existen efectos beneficiosos plausibles derivados de esta nueva estrategia terapéutica (Coutinho et al, 2016b).

4. Modelos celulares de enfermedad: iPSCs

Los modelos animales son actualmente una herramienta fundamental en el estudio de cualquier enfermedad, y como cualquier otra herramienta, presentan ventajas y desventajas. En algunos casos son la única opción razonable para determinadas investigaciones, pero en muchos otros hay que pasar por otro tipo de modelos antes de llegar al animal, como bien dicta la ley europea acerca de las 3R (reducir, reciclar y reutilizar). Y es que, aunque los modelos animales presentan la clara ventaja de ser un organismo completo, también tienen muchas limitaciones. Entre otras, se trata de especies diferentes al ser humano, por lo que sus farmacocinéticas también difieren; normalmente los estudios se realizan solo en machos jóvenes para reducir variabilidad y costes; en raros casos los modelos animales presentan neurodegeneración similar a la presente en humanos, etc. Sin embargo, estas limitaciones no implican que los resultados obtenidos con modelos animales sean menos relevantes, si no que otros modelos pueden dar otro tipo de información, complementaria y útil (Hartung, 2008).

Los modelos celulares de enfermedades genéticas resultan una opción efectiva en la determinación de los mecanismos moleculares de enfermedad, así como en el ensayo de distintas aproximaciones terapéuticas. Pero como pasaba con los modelos animales, estos también tienen limitaciones, siendo la más destacable el hecho de que estos modelos no reflejan totalmente las posibles reacciones de un organismo completo ante distintos compuestos. Sin embargo, sí que son una herramienta potente para realizar pruebas preliminares de tratamientos potenciales y en la evaluación de los mecanismos por los cuales estos compuestos actúan en la célula (Gaffke et al, 2019). Hasta hace unos años, los cultivos de células humanas se limitaban al uso de líneas celulares inmortalizadas obtenidas de biopsias tumorales, o a células primarias de pacientes. Aunque estos cultivos celulares son herramientas valiosas en algunos aspectos, las biopsias tumorales están muy limitados por la presencia de aberraciones genéticas y epigenéticas, así como cariotipos inestables o expresión de oncogenes, y las células primarias no son un material fácilmente disponible, más si hablamos de cultivos celulares del CNS.

En la última década, el descubrimiento de métodos para reprogramar las células somáticas en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) (Takahashi et al, 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006) ha supuesto un gran avance para el estudio y tratamiento de muchas enfermedades (Hockemeyer & Jaenisch, 2016; Kavyasudha et al, 2018). La aplicabilidad de esta nueva tecnología en diferentes campos de la biología le supuso el premio Nobel en 2012 a Yamanaka. El potencial que tienen las iPSCs se basa en su capacidad para ser diferenciadas a muchos tipos celulares, incluyendo aquellos más relevantes para la enfermedad a estudiar. Además, presentan exactamente la misma dotación genética que las células de las que han sido derivadas, normalmente fibroblastos de pacientes. Es por ello que con esta tecnología se pueden generar *in vitro* tipos celulares difíciles de obtener directamente (como células del CNS), con el mismo genoma del donante (Figura 19), y reduciendo los problemas éticos derivados del trabajo con modelos animales o con células madre humanas embrionarias.

En el campo de las enfermedades raras, las iPSCs han permitido un estudio más profundo de los mecanismos moleculares de muchas enfermedades, así como un mejor

análisis de potenciales agentes terapéuticos, todo gracias a la posibilidad de generar nuevos modelos de un tipo celular de interés y genéticamente iguales a los pacientes, como ha sucedido en muchas LSDs (revisado en Borger et al, 2017; Zunke & Mazzulli, 2019).

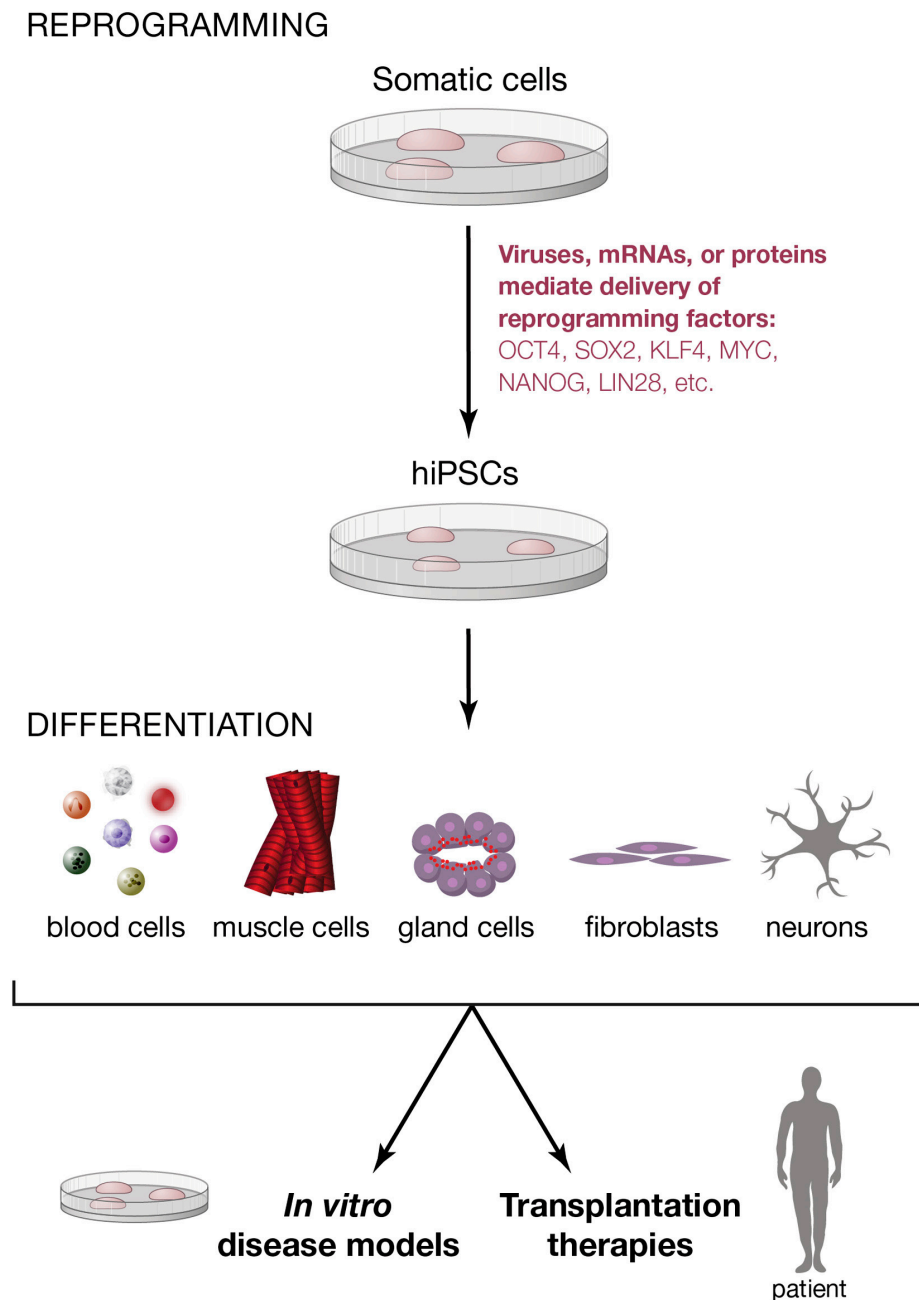


Figura 19. Visión general de la reprogramación y diferenciación de iPSC, así como de sus principales aplicaciones: generación de modelos *in vitro* de enfermedades, y terapia celular (Hockemeyer & Jaenisch, 2016).

4.1. Reprogramación de células somáticas

La reprogramación de células somáticas adultas a iPSCs implica volver a un estado de pluripotencia, y el avance decisivo en la inducción de esta pluripotencia surgió con los resultados obtenidos por Shinya Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006). En este estudio se sugería que la expresión mediante retrovirus de 4 factores de transcripción ligados a pluripo-

tencia, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*, promovía la desdiferenciación de fibroblastos de ratón hacia iPSCs. Estos genes pasarían a formar el llamado *cocktail* de Yamanaka. Un año después, se consiguieron los mismos resultados con células humanas (Takahashi et al, 2007).

En los años siguientes surgieron múltiples estudios replicando el mismo protocolo, pero usando distintas fuentes celulares además de los fibroblastos, como células de pulmón, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, células derivadas de adipocitos, hepatocitos, queratinocitos, células madre neurales, etc. También se han establecido nuevas combinaciones de factores que inducen la pluripotencia, así como nuevos sistemas de liberación de dichos factores, tanto integrativos como no integrativos (Figura 19) (revisado en Kavyasudha et al, 2018).

La reprogramación de células somáticas es un proceso que puede llevar varios meses, dependiendo del tipo celular, y una vez se dispone de colonias de iPSCs, estas tienen que someterse a un proceso de validación para confirmar su pluripotencia (revisado en Tiscornia et al, 2011). Actualmente existen bancos de células con iPSCs derivadas de pacientes con distintas enfermedades al alcance de los investigadores, y también con controles.

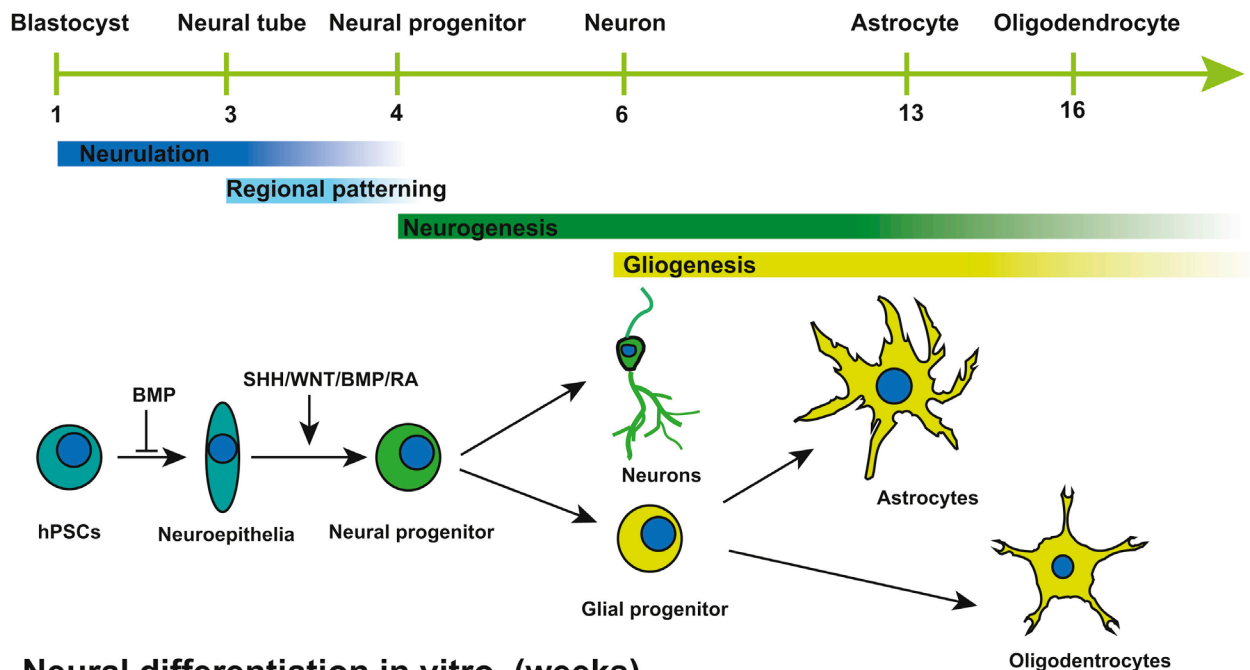
4.2. Diferenciación de las iPSCs a células del CNS

Aunque las iPSCs, al igual que las células madre humanas embrionarias, pueden ser diferenciadas a cualquier tipo celular, la obtención de tipos celulares del CNS presenta un valor añadido. Esto es debido a la existencia de pocas alternativas para obtenerlos de una fuente directa, como el cerebro. Por ello, se han descrito diferentes protocolos para diferenciar células pluripotentes, como las iPSCs, a distintos tipos celulares del CNS. Además, estos protocolos han podido ser reproducidos en diferentes laboratorios.

Desde un inicio, los protocolos de diferenciación para la obtención de tipos celulares neurales se basan en la imitación del desarrollo embrionario. Es decir, la presencia o ausencia de distintos factores cruciales para el desarrollo es lo que dirige la identidad celular hacia un tipo celular u otro. Además, las propias células pluripotentes *in vitro* también mantienen su estado de pluripotencia gracias a factores del medio que promueven su autorrenovación. Para favorecer la diferenciación de estas células pluripotentes a ectodermo (una de las tres capas embrionarias, la que dará lugar a tipos celulares neurales, entre otros) se ha establecido que hay que eliminar los componentes que favorecen su autorrenovación y mantenerlas en un medio libre de suero (Figura 20) (Reubinoff et al, 2001; Zhang et al, 2001). Sin embargo, será la adición o no de factores de crecimiento concretos lo que establezca la identidad celular, ya que serán los que definan la transcripción génica específica (Figura 20). Estos factores de crecimiento se establecieron al ver que son los encargados de coordinar los gradientes espacio-temporales de los ejes antero-posterior y dorso-ventral durante el desarrollo *in vivo* (revisado en Tao & Zhang, 2016).

Algunos de los protocolos de diferenciación descritos implican la obtención de cualquier linaje neural (Chambers et al, 2009), mientras que otros han desarrollado métodos más precisos para obtener tipos neuronales específicos, como neuronas dopaminérgicas (Cooper et al, 2010; Fasano et al, 2010; Kriks et al, 2011), colinérgicas (Bissonnette et al, 2011), o GABAérgicas (Maroof et al, 2013; Nicholas et al, 2013; Stanslowsky et al, 2016).

Neural development in vivo (weeks)



Neural differentiation in vitro (weeks)

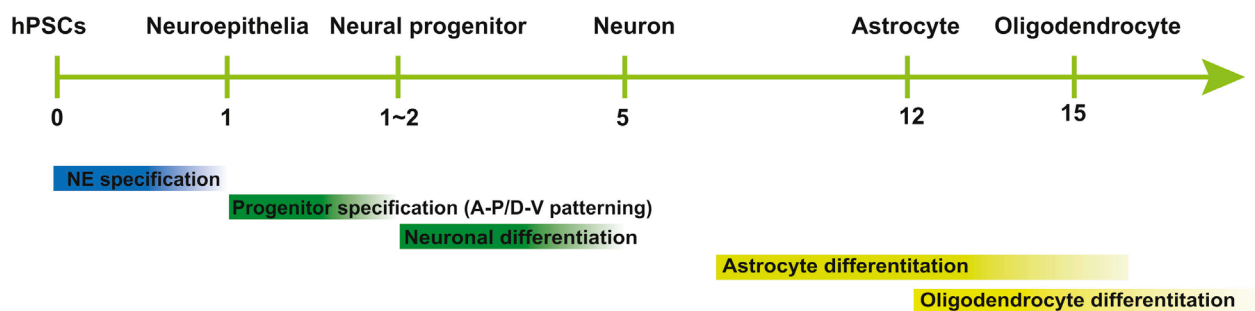


Figura 20. Esquema en paralelo de los pasos y factores que dirigen el desarrollo neural in vivo y la diferenciación in vitro (Tao & Zhang, 2016).

Sin embargo, las neuronas no son el único tipo celular implicado en la correcta función del CNS, y ha sido en los últimos años cuando diferentes estudios han evidenciado el papel relevante de las células de glía, y más específicamente los astrocitos, en la regulación de la función neuronal y la homeostasis (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Es por ello que en la última década se han ido publicando también protocolos de diferenciación para obtener astrocitos a partir de células pluripotentes (Emdad et al, 2012; Gupta et al, 2012; Krencik et al, 2011; Krencik & Zhang, 2011; Lundin et al, 2018; Roybon et al, 2013; Santos et al, 2017; Serio et al, 2013). Sin embargo, todos estos protocolos son muy largos y complejos, llegando a necesitar varias semanas para una diferenciación completa, o incluso meses para que se alcance la maduración, y además las células obtenidas no siempre están bien caracterizadas (Tao & Zhang, 2016).

En muchas ocasiones, como en aplicaciones clínicas o en el cribado de posibles agentes terapéuticos, se requiere de producciones de células diferenciadas a gran escala y con un alto índice de pureza, algo difícil de conseguir con protocolos tan a largo plazo. Es por ello que en los últimos años se ha desarrollado otra estrategia para una diferenciación

más eficiente de las iPSCs a los tipos celulares deseados, la sobreexpresión ectópica de factores de transcripción específicos de linaje celular (Oh & Jang, 2019).

4.2.1. Diferenciación directa a neuronas

La diferenciación directa mediante la expresión ectópica de factores de transcripción se llevó a cabo inicialmente para obtener neuronas corticales excitatorias a partir de células pluripotentes (Zhang et al, 2013). En este caso se sobreexpresó el gen *Ngn2* fusionado al gen de resistencia a la puromicina (Figura 21), el cual permite una posterior selección para poder obtener una población homogénea de neuronas inducidas (iNs, del inglés *induced Neurons*). Estas iNs son capaces de desarrollar sinapsis funcionales *in vitro* cuando se encuentran en co-cultivo con células gliales, lo cual las convierte en un modelo neuronal humano fisiológicamente muy útil. Además, este protocolo es mucho más rápido que los anteriormente nombrados, pudiendo obtener iNs positivas para marcadores típicos neuronales (MAP2 y Tuj1) tras solo una semana de diferenciación, y sinapsis funcionales tras dos semanas (Zhang et al, 2013).

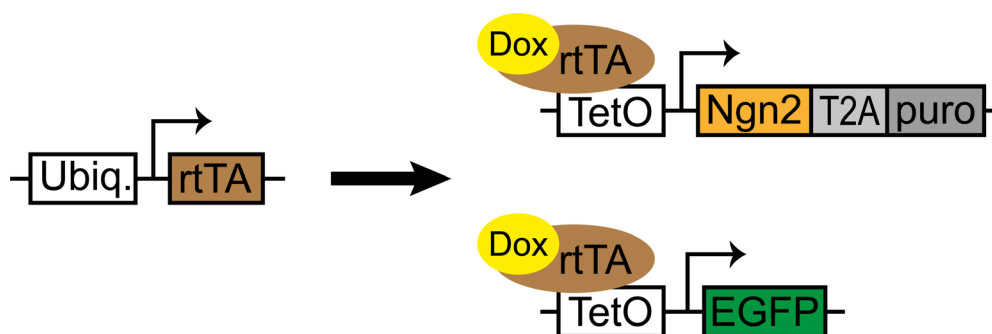


Figura 21. Diseño de los vectores lentivirales para la conversión de células pluripotentes en neuronas mediante la sobreexpresión de *Ngn2*. Las células son transducidas siempre por dos virus: uno que expresa rtTA de forma constitutiva (izquierda), y otro que expresa *Ngn2* y resistencia a puromicina (arriba derecha) como proteína de fusión unida por la secuencia T2A. Adicionalmente, pueden ser transducidas por un virus expresando EGFP (abajo derecha). El promotor tetO se activa con la adición de doxiciclina (Dox) al medio (adaptada de Zhang et al, 2013).

4.2.2. Diferenciación directa a astrocitos

Más recientemente se ha descrito un protocolo que sigue los mismos principios que el descrito para la obtención de neuronas en el apartado anterior, pero que permite la rápida obtención de astrocitos *in vitro* (Canals et al, 2018). Estos astrocitos inducidos (iAs, del inglés *induced Astrocytes*) se obtienen mediante la sobreexpresión de dos factores de transcripción fusionados a distintas resistencias a antibióticos: el gen *Nfib* va fusionado a la resistencia a hygromicina, mientras que el gen *Sox9* va fusionado a la resistencia a puromicina (Figura 22). En comparación con protocolos anteriores, este protocolo reduce el tiempo necesario para la obtención de astrocitos, permitiendo obtener iAs maduros y funcionales en tan solo 2 semanas. Marcadores específicos de astrocitos (S100b, GFAP, VIM and CD44) se detectan a los 7 días de la inducción de la diferenciación, mientras que a los 21 días se alcanza un perfil de expresión génica similar a los astrocitos humanos maduros. Además, a los 14 días estos iAs muestran funciones astrocíticas importantes, como la captación de glutamato, ondas de calcio, respuesta a citoquina o uniones gap funcionales. Los gránulos de glucógeno se em-

piezan a detectar a las dos semanas de diferenciación, mientras que tras cuatro semanas de co-cultivo con iNs también hay una mejora en el soporte para la formación de sinapsis (Canals et al, 2018).

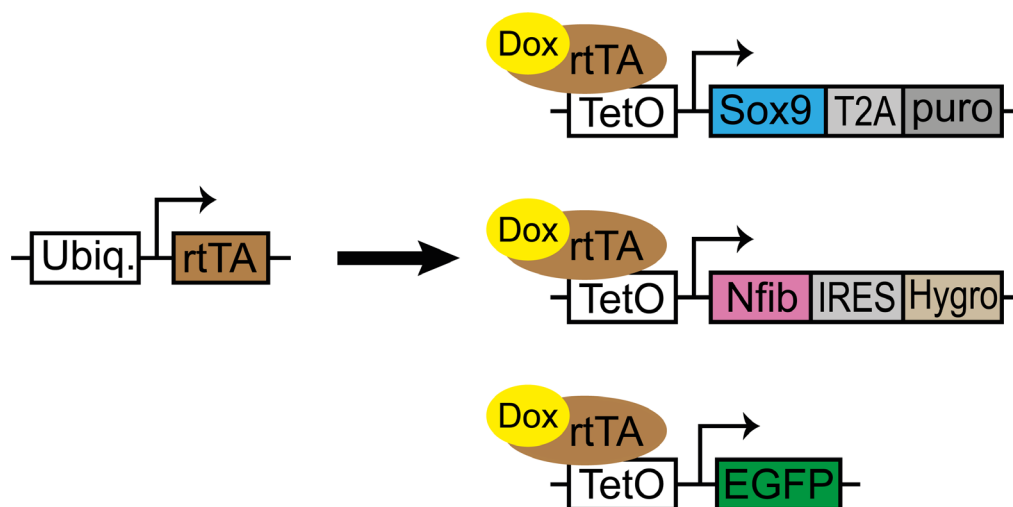


Figura 22. Diseño de los vectores lentivirales para la conversión de células pluripotentes en astrocitos mediante la sobreexpresión de Nfib y Sox9. Las células son transducidas siempre por tres virus: uno que expresa rtTA de forma constitutiva (izquierda), otro que expresa Sox9 y resistencia puromicina (arriba derecha), y otro que expresa Nfib y resistencia a higromicina (centro derecha). Adicionalmente, pueden ser transducidas por un virus expresando EGFP (abajo derecha). El promotor tetO se activa con la adición de doxiciclina (Dox) al medio (adaptada de Canals et al, 2018).

4.3. Modelos celulares para el síndrome de Sanfilippo

Antes del uso de iPSCs para modelar el síndrome de Sanfilippo, otros sistemas fueron desarrollados para estudiar esta enfermedad. El primer intento fue el tratamiento de células madre de cabra para inducir el almacenamiento de gangliósidos, factor observado previamente en cerebros de cabras modelo de Sanfilippo D (Liour et al, 2001). Años después, otro grupo de investigación consiguió aislar células neuronales del cerebelo de ratones con Sanfilippo A y cultivarlas (Sutherland et al, 2008), aunque el cultivo era un conjunto de distintos tipos celulares y no se apreciaron diferencias morfológicas al comparar con controles, excepto el acúmulo progresivo de HS. Posteriormente, el uso de shRNAs permitió inhibir el gen *NAGLU* (Sanfilippo B) en células HeLa, propiciando la formación de vacuolas de almacenamiento, así como otras alteraciones celulares (Roy et al, 2012).

Sin embargo, estos sistemas presentan diferentes limitaciones, como que las células analizadas o no son humanas, o no son neurales, pudiendo no presentar los mismos mecanismos moleculares que encontraríamos en células neurales humanas. Fue la aplicación de la tecnología de iPSCs a la investigación del síndrome de Sanfilippo la que permitió generar modelos más específicos de esta enfermedad.

En 2011 se publicó un trabajo en el que mediante el uso de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes se generaba un modelo neural para Sanfilippo B tras una diferenciación de hasta 7 semanas (Lemonnier et al, 2011). Este modelo recapitulaba la presencia de vacuolas de almacenamiento, alteraciones en el aparato de Golgi y reducción en la expresión de genes relacionados con la matriz extracelular, los lisosomas y el aparato de Golgi.

Sin embargo, las células obtenidas eran una mezcla de células diferenciadas y precursores neurales. Más tarde se publicó otro trabajo en el que, usando el mismo modelo, se describían otras alteraciones que podían estar implicadas en el fenotipo neurológico de Sanfilippo B, como la alteración en la polarización celular o la migración (Bruyère et al, 2015).

En 2015 nuestro grupo publicó un modelo neuronal para el síndrome de Sanfilippo C basado en iPSC (Canals et al, 2015). Hasta el momento esta enfermedad no disponía de ningún modelo animal o celular en el que estudiar sus bases moleculares, un aspecto de gran relevancia debido a que es el único subtipo causado por mutaciones en una proteína de la membrana lisosomal. En este trabajo se reprogramaron fibroblastos de dos pacientes y un control a iPSC para posteriormente diferenciarlas a un conjunto de neuronas y astrocitos en un periodo de entre 3 y 9 semanas. Estas células diferenciadas presentaban ausencia de actividad para HGSNAT, así como un acúmulo progresivo de GAGs y alteraciones lisosómicas. Esta progresión llegaba a niveles críticos en la novena semana, en concordancia al avance de la enfermedad en los pacientes. También se midió la actividad de la red neuronal mediante ondas de calcio y se vio que a las 3 semanas las neuronas de pacientes ya reducían drásticamente su actividad espontánea, sugiriendo que la enfermedad altera notablemente la función cerebral en los pacientes.

Sin embargo, tanto en el caso del modelo neural de Sanfilippo B como en el de Sanfilippo C existen diferentes limitaciones. Por un lado, los protocolos de diferenciación usados son largos y complejos. Además, estos protocolos son muy variables entre diferentes líneas y experimentos, ya que cada vez la respuesta a los factores añadidos es ligeramente diferente y las células obtenidas pueden variar. Por otro lado, tras la diferenciación se obtiene un conjunto de distintos tipos celulares diferenciados, o incluso precursores. La falta de pureza en los cultivos unida a la complejidad y duración de los protocolos de diferenciación hace que el uso de estos modelos en diferentes estudios no sea la mejor opción. Una solución a estos problemas puede ser el uso de otros métodos de diferenciación más rápidos, fáciles y eficientes, como son los protocolos basados en la sobreexpresión de factores de transcripción específicos de tipo celular, comentados en apartados anteriores.

Aunque para Sanfilippo A no se ha generado ningún modelo neural humano *in vitro*, recientemente se ha publicado la obtención de dos líneas de iPSCs de una misma línea de fibroblastos de paciente (Vallejo et al, 2018), que podrían usarse también para la generación de estos modelos celulares. También para Sanfilippo B se ha publicado la obtención de nuevas líneas de iPSCs provenientes de fibroblastos de pacientes (Huang et al, 2019; Vallejo-Diez et al, 2018).

No obstante, aunque se disponga de iPSCs obtenidas de pacientes, con distintos subtipos de Sanfilippo, y se conozcan protocolos de diferenciación como los mencionados para generar modelos neurales humanos *in vitro* de estas enfermedades, se debe tener en cuenta que el fondo genético de las distintas líneas celulares también puede afectar a los resultados. Por este motivo, la generación de líneas isogénicas en las que la única diferencia entre la línea afectada y el control sea la alteración del gen causante de la enfermedad, se está convirtiendo en una estrategia muy utilizada. Para la fácil obtención de líneas isogénicas, la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 ha supuesto un gran avance.

5. CRISPR/Cas9

5.1. Origen, estructura y función

Durante décadas se ha intentado manipular el genoma con gran diversidad de técnicas, como las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs, del inglés *Zinc Finger Nucleases*) (revisado en Carroll, 2011) (Figura 23A) o las nucleasas efectoras similares al activador de transcripción (TALENs, del inglés *Transcription Activator-like Effector Nucleases*) (revisado en Zhang et al, 2014) (Figura 23B). Sin embargo, fue en el 2012 cuando este campo dio un salto significativo con la descripción de la posibilidad de programar el sistema formado por las llamadas Repeticiones Palindrómicas Cortas Interespaciadas Regularmente y Agrupadas (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y sus elementos asociados Cas (Jinek et al, 2012). Ahora esta nueva técnica es más conocida como CRISPR/Cas9 (Figura 23C), por la popularidad que ha adquirido una de sus nucleasas asociadas, la Cas9.

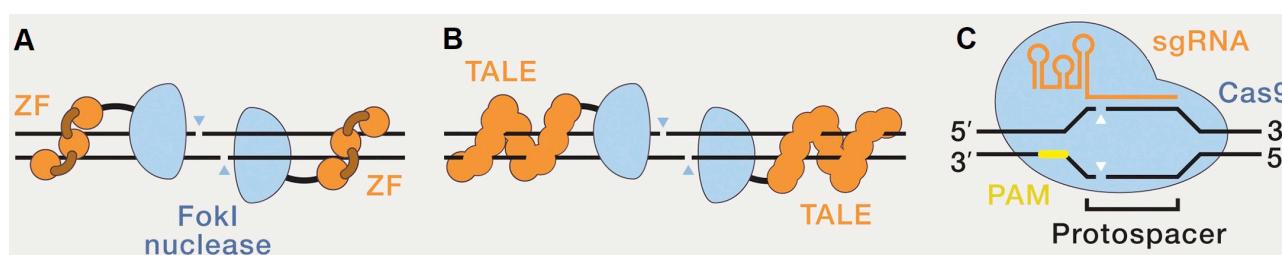


Figura 23. Técnicas para la edición génica. (A) ZFNs, (B) TALENs y (C) CRISPR/Cas9 (adaptada de Komor et al, 2017).

La metodología CRISPR/Cas9 nace de la posibilidad de programar un sistema inmunitario natural de los procariotas (Mojica et al, 2005) para convertirlo en una herramienta de ingeniería genética. Dos estudios fueron los que ayudaron en la obtención de esta herramienta. En el primero se demostró que Cas9, nucleasa de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, actuaba como ribonucleoproteína (RNP) capaz de cortar la doble cadena de DNA en combinación con crRNA, un componente del sistema (Gasiunas et al, 2012). Y en el segundo se demostró que había 3 componentes esenciales para que el sistema CRISPR/Cas9 funcionara: la endonucleasa Cas9 y dos RNAs: crRNA y tracrRNA (Figura 24A). Además, también se vio que los dos RNAs se podían unir para simplificar la técnica, obteniendo el sgRNA (Figura 24B) (Jinek et al, 2012). El sistema CRISPR/Cas9 se consolidó como herramienta de edición génica en 2013, cuando distintos grupos publicaron su éxito en la edición del genoma de distintos mamíferos (Cong et al, 2013; Mali et al, 2013).

Esta herramienta ha adquirido alto éxito en comparación a las anteriormente utilizadas ZNFs y TALENs debido a sus múltiples ventajas. Por un lado, no depende de la programación de proteínas, como pasaba con sus antecesoras, si no solamente del reconocimiento entre los pares de bases del DNA diana y el sgRNA. Además, es de fácil diseño, ya que solo se requiere de la síntesis de un nuevo fragmento de unos 20 nucleótidos de RNA que hibride con la secuencia de DNA diana deseada, ya que el resto de la secuencia del sgRNA

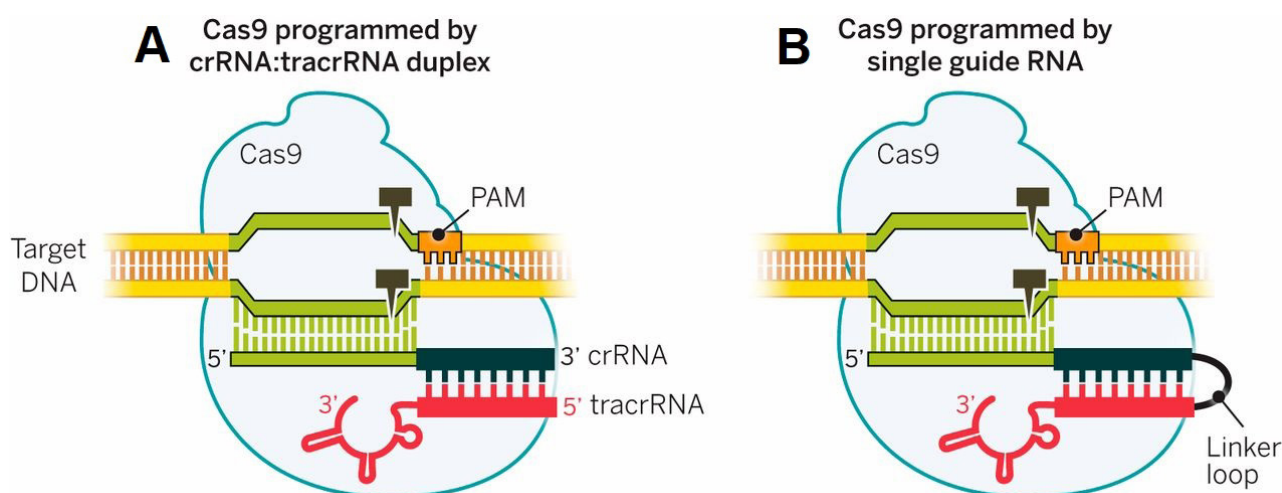


Figura 24. Estructura del sistema CRISPR/Cas9 estando la nucleasa Cas9 programada por dos RNAs separados, crRNA y tracrRNA (A), o estos unidos por un *linker* formando el sgRNA (B) (Doudna & Charpentier, 2014).

es siempre la misma cuando se usa la proteína Cas9. Con esto se evitan largos procesos necesarios para el diseño y clonaje de dominios proteicos enteros en la edición basada en ZNFs o TALENs (Carroll, 2011; Zhang et al, 2014). Este fácil diseño y obtención del sistema también ha ayudado al abaratamiento de costes en relación a las anteriores técnicas. Por otro lado, se ha visto su utilidad usando simultáneamente distintos sgRNAs para editar diferentes *loci* (Wang et al, 2013), permitiendo así también la generación de grandes reordenamientos cromosómicos (Torres et al, 2014; Xiao et al, 2013), alteraciones anteriormente muy difíciles de obtener.

5.2. Métodos

5.2.1. Componentes

En primer lugar, se requiere introducir todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en las células que se quieren editar. Estos pueden ser incorporados a través de un vector de DNA, en forma de RNA (mezcla de mRNA de la Cas9 y sgRNA) o en forma de RNP (Figura 25). Aunque las tres estrategias han resultado exitosas, la RNP confiere la ventaja de evitar depender de muchos mecanismos celulares (transcripción y traducción) para llegar al núcleo y realizar el corte en el DNA diana, además de reducir la posibilidad de ediciones fuera de la secuencia diana (*off-targets*) al estar menos tiempo en la célula (DeWitt et al, 2017).

5.2.2. Introducción en las células

Existen muchas formas de introducir los componentes necesarios en las células, y usar una u otra dependerá del tipo de célula utilizada y la finalidad. Los métodos inicialmente más usados para la introducción de los componentes de CRISPR/Cas9 en células *in vitro* son la microinyección, la electroporación, la transfección y los vectores virales y no virales, como nanopartículas (Wilbie et al, 2019). Además, en los últimos años han surgido dos

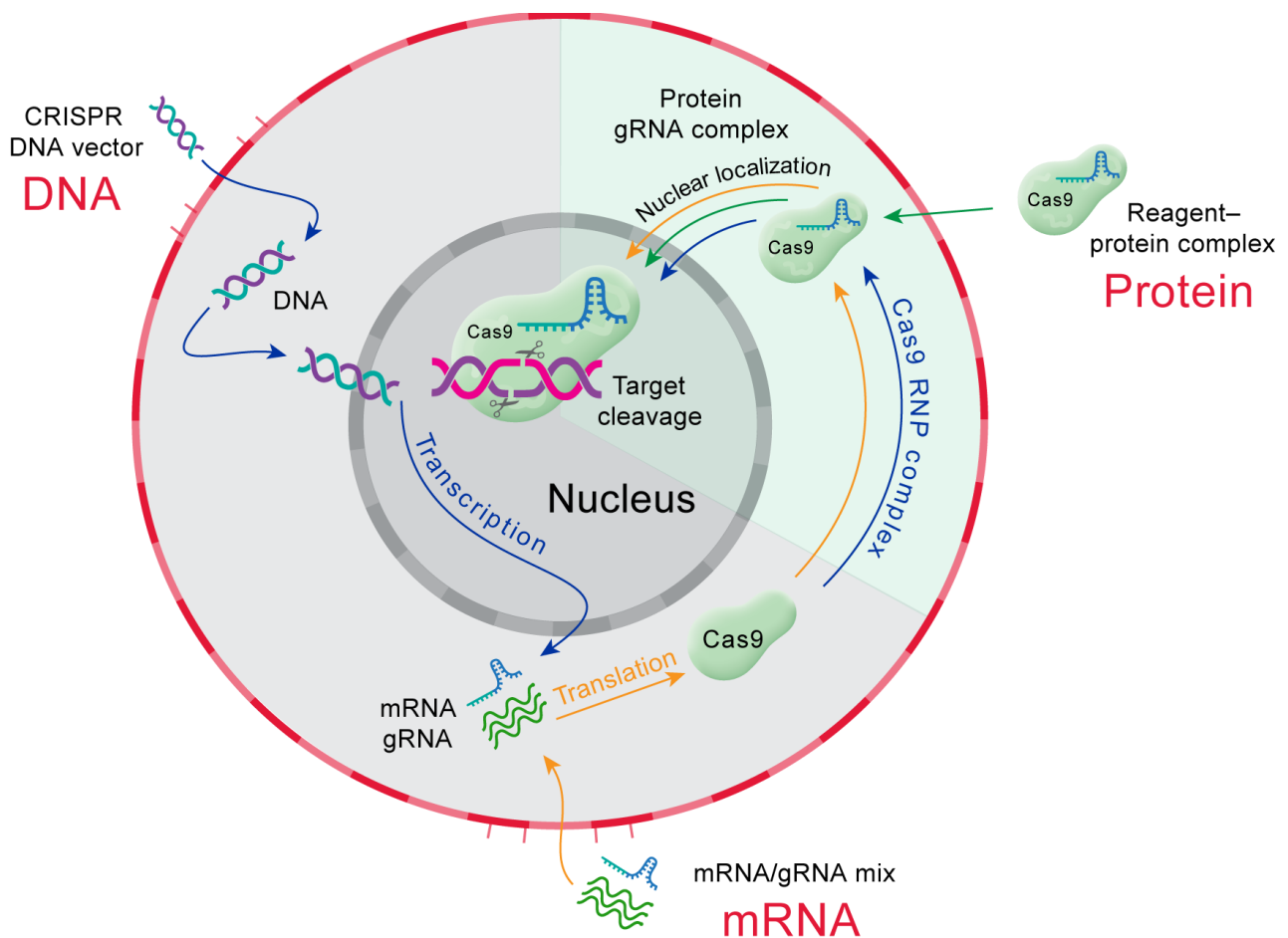


Figura 25. Opciones para la introducción de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en la célula. Se puede hacer tanto a nivel de DNA, como RNA, como RNP (adaptado de: *CRISPR/Cas9 genome editing flyer*, por Thermo Fisher Scientific).

métodos más pero que aún no están tan extendidos ni contrastados como los anteriores, que son la transducción inducida por osmocitos y propano-betaína (conocida como iTOP) (D'Astolfo et al, 2015), y la internalización asistida por una membrana de filtración (conocida como TRIAMF) (Yen et al, 2018).

5.2.3. Mecanismo de acción

Ya en el interior de la célula, los componentes del sistema CRISPR/Cas9 deben actuar en la diana genómica correspondiente. Una vez formado el complejo Cas9-sgRNA, si el DNA diana presenta una secuencia PAM compatible con la nucleasa empleada, este complejo será capaz de localizar la secuencia diana del DNA por complementariedad con la secuencia del sgRNA. Dependiendo de la Cas utilizada, esta secuencia PAM variará. Para la nucleasa Cas9 la PAM necesaria es 5'-NGG (Figura 23C y 24) (Jinek et al, 2012). Aunque la presencia de la PAM limita el número de sitios genómicos susceptibles de edición, la existencia de múltiples nucleasas Cas con distintos requerimientos de PAM amplía el abanico (Komor et al, 2017).

Una vez localizada la secuencia diana de DNA, la nucleasa Cas9 realizará un corte en las dos hebras del DNA que puede ser reparado de distintas formas. Por defecto actuará el mecanismo celular encargado de la unión de los extremos no homólogos (NHEJ, del inglés

non-homologous end joining) (Figura 26A), pero si se añade una secuencia molde junto con los componentes del sistema CRISPR/Cas9, se puede llegar a realizar una recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*) (Figura 26B). Usando dos sgRNAs cuyas secuencias dianas estén a una distancia razonable, y si la Cas9 realiza el corte de forma simultánea, el fragmento intermedio puede delecionarse por completo, generarse una inversión, o incluso una translocación (Figura 26C) (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).

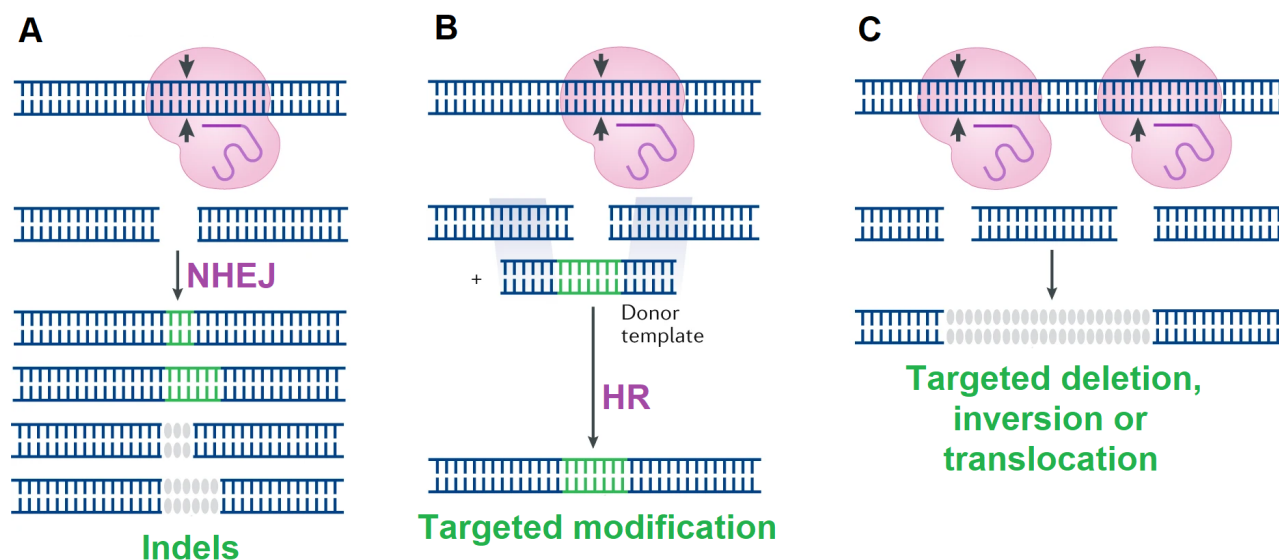


Figura 26. Posibles reparaciones de la doble cadena de DNA tras el corte generado por la acción de la nucleasa Cas. (A) NHEJ es el mecanismo celular que actúa por defecto, (B) HR ocurre cuando se ha introducido un DNA molde, y (C) Las grandes deleciones, inversiones o translocaciones se pueden generar al introducir dos sgRNAs en una misma célula, con secuencias diana próximas (adaptado de Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).

Hay que tener en cuenta que en cada célula este proceso puede ser diferente. Es decir, no todas las células habrán adquirido exitosamente los componentes del sistema, ni se habrá realizado corte en la doble cadena de DNA, ni se habrá llevado a cabo la reparación de la misma forma. Es por ello que, si hay elección, se recomienda realizar selección clonal de las células resultantes y un análisis independiente de la mutación que tiene cada clon para encontrar aquella que interesa.

5.3. Variantes y aplicaciones

Como se ha mencionado anteriormente, existen muchas proteínas Cas en el reino procariota, aunque la primera en ser usada con la finalidad de editar un genoma eucariota fue la Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, que realiza cortes en ambas hebras de la cadena del DNA diana. Cada proteína Cas tiene distintas cualidades que han ayudado a desarrollar una amplia gama de herramientas para editar el genoma a distintos niveles.

Cualidades que difieren entre distintas Cas son, por ejemplo, la PAM exigida en el DNA diana (Hu et al, 2018), su especificidad y con ello la posible generación de off-targets (Casini et al, 2018), su tamaño (Burstein et al, 2017) o el tipo de corte generado (Zetsche et al, 2015). Además, también existen Cas que tienen como diana el RNA (Abudayyeh et al,

2016) o que tienen actividades enzimáticas alternativas, bien de forma natural (Sinkunas et al, 2011) o generadas *in vitro* al fusionarlas con otras enzimas. Este último caso es el que ha dado pie al desarrollo del *prime editing*, una tecnología altamente eficiente para la edición de bases que implica la fusión de una Cas9 que únicamente corta una de las hebras del DNA, con editores de bases de adenina o desaminasas, y una retrotranscriptasa (Anzalone et al, 2019).

Con la gran variedad de nuevas herramientas generadas, muchas veces combinables, que han derivado de la tecnología CRISPR/Cas9, las aplicaciones que pueden llegar a tener son inimaginables. Por nombrar las principales áreas de aplicación (Figura 27): edición génica, regulación génica, edición epigenómica, visualización de la cromatina, estudios sobre la topología de la cromatina, interacción con el RNA y edición de bases.

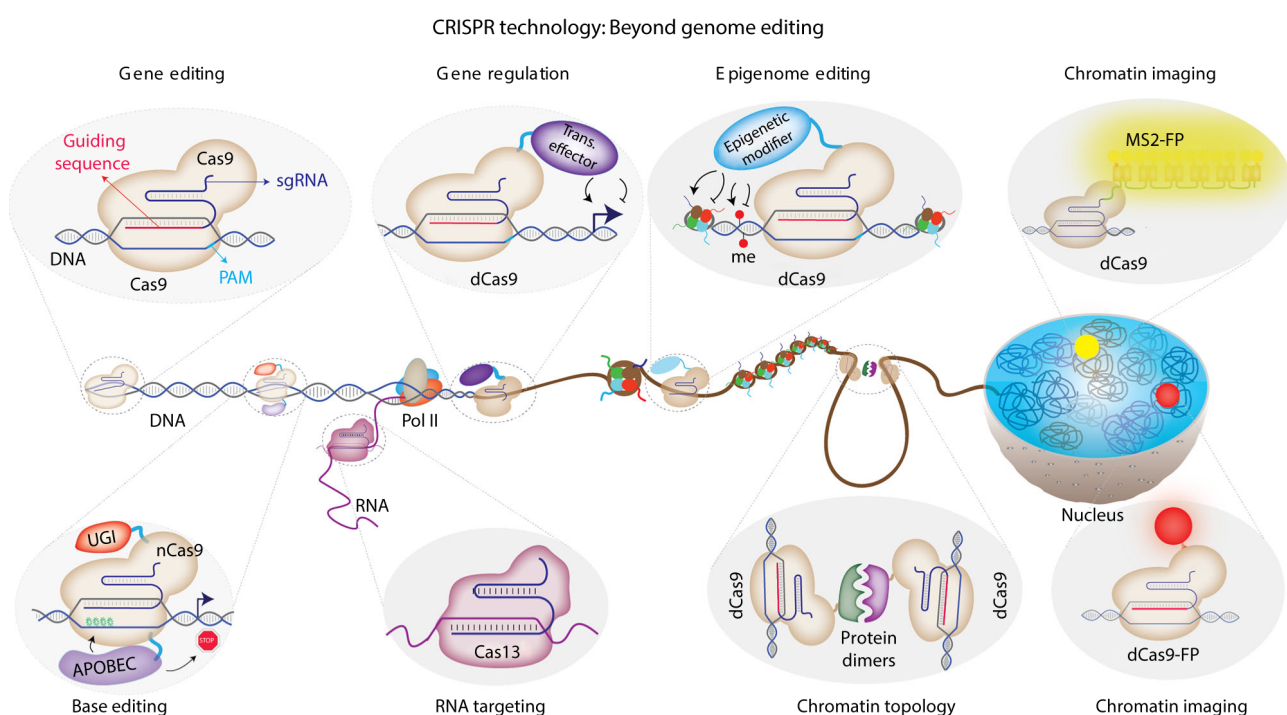


Figura 27. Principales áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 y sus variantes. Mientras que la Cas9 permite la edición génica gracias a su capacidad de corte de la doble cadena de DNA, la dCas9 (sitio catalítico deficiente) fusionada con otras proteínas puede llevar a cabo funciones de regulación génica, edición epigenómica, visualización de cromatina, así como manipulación y estudio de la topología de la cromatina. Además, la nCas9 (Cas9 que corta únicamente una de las hebras de DNA) está siendo usada para una edición de pares de bases más eficiente. Por otro lado, nuevos sistemas CRISPR/Cas que tienen como diana el RNA están siendo estudiados en más profundidad actualmente (Adli et al, 2018).

5.4. CRISPR/Cas9 e iPSC en la generación de nuevos modelos

Como se ha mencionado en apartados anteriores, los modelos tanto animales como celulares son una herramienta fundamental en el estudio de cualquier enfermedad. Concretamente, los modelos basados en iPSCs han permitido un estudio más profundo de muchas enfermedades, incluyendo un mejor análisis de potenciales agentes terapéuticos, gracias a la aplicación de novedosos protocolos de diferenciación. Por otro lado, la tecnología CRISPR/Cas9 aplicada a la edición génica ha permitido la generación de muchos modelos de enfermedad, tanto animales (Niu et al, 2014; Shao et al, 2014; Shen et al, 2013) como celulares (Liu et al, 2016; Loayza-Puch et al, 2016; Mavuluri et al, 2016). El presente trabajo

se centrará en la edición génica mediada por CRISPR/Cas9 aplicada a las iPSCs para la generación de modelos de enfermedades monogénicas.

Aunque los modelos derivados de iPSCs tienen muchas ventajas, una limitación muchas veces obviada es la variabilidad entre líneas de iPSCs en su potencial de diferenciación y su comportamiento. Estas variaciones son impredecibles y vienen dadas por diferencias en el fondo genético y el método de reprogramación de dicha línea. Es por ello que pequeñas variaciones fenotípicas entre células derivadas de iPSCs de pacientes o controles pueden no ser debidas a la enfermedad que se está estudiando, si no a dicha variación entre líneas (Soldner & Jaenisch, 2012; Sternecker et al, 2014; Ben Jehuda et al, 2018).

La generación de líneas isogénicas de iPSCs de pacientes y controles que únicamente se diferencien en la mutación causante de la enfermedad estudiada lleva usándose como control de la variabilidad entre líneas desde hace algunos años, y ha permitido definir diferencias sutiles pero relevantes en enfermedades monogénicas (Soldner et al, 2011). Pero ha sido con el desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9 que esta estrategia se ha extendido y aplicado a muchas enfermedades (Ben Jehuda et al, 2018).

Las iPSCs isogénicas pueden obtenerse de diferentes maneras. Dependiendo de si la línea de iPSCs inicial deriva de pacientes o de controles, el objetivo será revertir o inducir la mutación deseada, respectivamente (Figura 28). Por otro lado, se debe elegir la manera más adecuada para modificar el genoma, ya sea edición de bases, HR o NHEJ. Esta última opción será interesante si se parte de una línea de iPSCs control y no se busca obtener ninguna mutación en especial, sino simplemente truncar el gen causante, ya que es la estrategia más fácil y eficiente (Figura 26 y 27) (Bassett, 2017; Ben Jehuda et al, 2018).

Una vez generadas las líneas isogénicas, estas servirán como base para el estudio de la enfermedad, pero también pueden ser de extrema utilidad en el ensayo de potenciales agentes terapéuticos, ya que las diferencias percibidas al aplicar el tratamiento solo serán debidas a este y no a las posibles diferencias de fondo genético entre las distintas iPSCs.

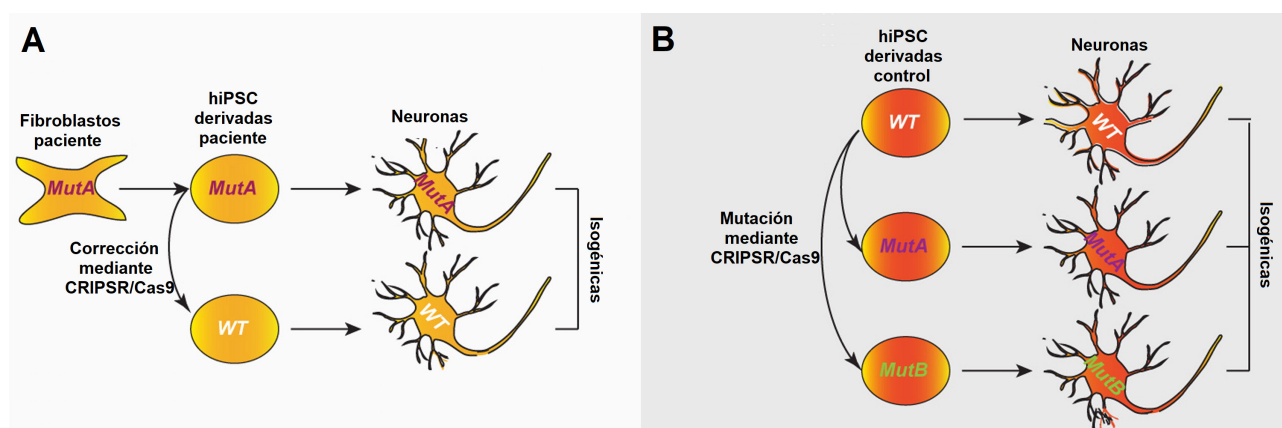


Figura 28. Estrategias para la obtención de líneas isogénicas. (A) Partiendo de una línea de iPSCs derivada de paciente con una mutación, mediante CRISPR/Cas9 se puede corregir esa mutación. (B) Partiendo de una línea de iPSCs WT control, se puede inducir la mutación deseada, o distintas mutaciones para ver los diferentes fenotipos (adaptada de Soldner et al, 2011).



OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido la generación de nuevos modelos celulares para el síndrome de Sanfilippo y su utilización para ensayar una aproximación terapéutica para esta enfermedad basada en el uso de siRNAs como terapia de reducción de sustrato.

Los objetivos concretos han sido:

Generación de modelos celulares

- Obtención y caracterización de líneas isogénicas con mutaciones en el gen *HGSNAT* derivadas de células madre pluripotentes inducidas de donantes sanos, mediante la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9.

- Diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas con mutaciones en el gen *HGSNAT* a neuronas y astrocitos, utilizando un protocolo optimizado.

- Obtención y caracterización de líneas isogénicas con mutaciones en el gen *NAGLU* derivadas de células madre pluripotentes inducidas de donantes sanos, mediante la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9.

Aproximación terapéutica basada en siRNAs

- Evaluación del efecto de diferentes siRNAs contra los genes *EXTL2* y *EXTL3*, como terapia de reducción de sustrato, en fibroblastos de pacientes de Sanfilippo C.

- Evaluación del efecto terapéutico de siRNAs contra el gen *EXTL2*, como terapia de reducción de sustrato, en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas con mutaciones en *HGSNAT*.



RESULTADOS

Informe de los directores de tesis acerca de la contribución de la doctoranda en cada artículo de esta tesis doctoral

Título de la tesis: iPSCs, CRISPR/Cas9 y protocolos de diferenciación basados en factores de transcripción para generar nuevos modelos neuronales y astrocíticos del síndrome de Sanfilippo.

Autora: Noelia Benetó Gandia

Directores: Dr. Isaac Canals Montferrer y Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Artículo 1

Título: *EXTL2* and *EXTL3* inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome

Autores: Isaac Canals, Noelia Benetó, Mónica Cozar, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg.

Publicación: Scientific Reports, 2015; 5:13654.

Factor de impacto (2015 JCR Science Edition): 5,228

Contribución de la estudiante: La estudiante llevó a cabo todos los experimentos necesarios para el proceso de revisión del manuscrito y participó en su interpretación. Así mismo, contribuyó a la revisión y corrección del texto. Este trabajo también formó parte de la elaboración de la tesis doctoral de I. Canals.

Artículo 2

Título: Generation of two compound heterozygous *HGSNAT*-mutated lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo C syndrome.

Autores: Noelia Benetó, Mónica Cozar, María García-Morant, Edgar Creus-Bachiller, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg, Isaac Canals.

Publicación: Stem Cell Research, 2019; 41:101616.

Factor de impacto (2018 JCR Science Edition): 3,929

Contribución de la estudiante: La estudiante participó en el diseño y concepción de este trabajo y llevó a cabo el trabajo experimental con ayuda de M. Cozar, E. Creus-Bachiller y M. García-Morant. Además, la estudiante realizó el correspondiente análisis e interpretación de los datos obtenidos y se encargó de escribir el primer borrador del manuscrito y participar en la revisión del mismo.

Artículo 3

Título: Neuronal and astrocytic differentiation from Sanfilippo C syndrome iPSC for disease modeling and drug development.

Autores: Noelia Benetó, Monica Cozar, Laura Castilla-Vallmanya, Oskar G. Zetterdahl, Madalina Sacultanu, Eulalia Segur-Bailach, María García-Morant, Antonia Ribes, Henrik Ahle-nius, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Isaac Canals.

Publicación: Journal of Clinical Medicine, 2020; 9, 644

Factor de impacto (2018 JCR Science Edition): 5,688

Contribución de la estudiante: Para este trabajo, la estudiante participó en el diseño y concepción del estudio, llevó a cabo la mayor parte del trabajo experimental con ayuda y colaboración de otros autores y realizó el correspondiente análisis e interpretación de los datos obtenidos. Posteriormente, la estudiante escribió el primer borrador del manuscrito y participó en la revisión del mismo.

Artículo 4

Título: Generation of two *NAGLU*-mutated homozygous cell lines from healthy induced plu-ri-potent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo B syndrome.

Autores: Noelia Benetó, Mónica Cozar, Laura Gort, Laura Pacheco, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg, Isaac Canals.

Publicación: Stem Cell Research, 2020; 42:101668

Factor de impacto (2018 JCR Science Edition): 3,929

Contribución de la estudiante: La estudiante participó en el diseño y concepción de este trabajo y llevó a cabo el trabajo experimental. Además, la estudiante realizó el correspon-diente análisis e interpretación de los datos obtenidos y se encargó de escribir el primer borrador del manuscrito y participar en la revisión del mismo.

Barcelona, 11 marzo 2020

Los directores,



Dr. Isaac Canals Montferrer

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Artículo 1



***EXTL2* and *EXTL3* inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome**

Isaac Canals, Noelia Benetó, Mónica Cozar, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg.

Resumen

El síndrome de Sanfilippo es una enfermedad rara de almacenamiento lisosómico causado por una alteración en la degradación del heparán sulfato (HS). Los pacientes presentan una neurodegeneración severa y progresiva para la que actualmente no existe un tratamiento efectivo. La terapia de reducción de sustrato (SRT) puede ser una opción útil para los trastornos neurológicos de este tipo, y se han probado varios enfoques hasta la fecha. Aquí usamos diferentes siRNAs dirigidos a los genes *EXTL2* y *EXTL3*, que son importantes para la síntesis de HS, como SRT en fibroblastos de pacientes con Sanfilippo C para disminuir el almacenamiento de glucosaminoglicanos (GAG) dentro de los lisosomas. Los resultados muestran una alta inhibición de los mRNA del gen *EXTL* diana (alrededor del 90%), una disminución en la síntesis de GAGs después de tres días (30-60%) y una disminución en el almacenamiento de GAGs después de 14 días (hasta 24%). Además, los análisis de inmunocitoquímica muestran una clara reversión del fenotipo después del tratamiento. La inhibición in vitro de genes implicados en la síntesis de HS utilizando estos siRNA es un primer paso en el desarrollo de una futura opción terapéutica para el síndrome de Sanfilippo C.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

***EXTL2* and *EXTL3* inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome**

Received: 30 November 2014

Accepted: 31 July 2015

Published: 08 September 2015

Isaac Canals^{1,2,3}, Noelia Benetó^{1,2,3}, Mónica Cozar^{1,2,3}, Lluïsa Vilageliu^{1,2,3,*} & Daniel Grinberg^{1,2,3,*}

Sanfilippo syndrome is a rare lysosomal storage disorder caused by an impaired degradation of heparan sulfate (HS). It presents severe and progressive neurodegeneration and currently there is no effective treatment. Substrate reduction therapy (SRT) may be a useful option for neurological disorders of this kind, and several approaches have been tested to date. Here we use different siRNAs targeting *EXTL2* and *EXTL3* genes, which are important for HS synthesis, as SRT in Sanfilippo C patients' fibroblasts in order to decrease glycosaminoglycan (GAG) storage inside the lysosomes. The results show a high inhibition of the *EXTL* gene mRNAs (around 90%), a decrease in GAG synthesis after three days (30–60%) and a decrease in GAG storage after 14 days (up to 24%). Moreover, immunocytochemistry analyses showed a clear reversion of the phenotype after treatment. The *in vitro* inhibition of HS synthesis genes using siRNAs shown here is a first step in the development of a future therapeutic option for Sanfilippo C syndrome.

Sanfilippo C syndrome, or mucopolysaccharidosis (MPS) IIIC, is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by mutations in the *HGSNAT* gene. This gene codes for an enzyme responsible for heparan sulfate (HS) degradation, and its dysfunction leads to the storage of partially degraded molecules inside the lysosomes¹. HS is one of the most common glycosaminoglycans (GAGs) located in the extracellular matrix as a part of proteoglycans, which participate in many different cellular functions². In the synthetic pathway of HS, there is an essential step in which the *EXTL* genes play a crucial role (reviewed in Ref. 3). In particular, *EXTL2* and *EXTL3* are key proteins involved in the HS chain elongation. Small interference RNAs (siRNAs), discovered in the late 1990s⁴, were shown to inhibit mammalian genes⁵, and may be applicable in substrate reduction therapy (SRT) for Sanfilippo C patients. For other types of MPS, two different approaches using siRNAs or shRNAs have been previously described which inhibit different genes in the HS synthetic pathway^{6,7}.

In this study we used four different siRNAs, two of which inhibit *EXTL2* and the other two inhibit *EXTL3*. These siRNAs were transfected into fibroblasts of two patients in an attempt to reduce HS synthesis. All four siRNAs obtained a notable reduction in the mRNA levels of the corresponding gene and decreased the rates of GAG synthesis and storage.

Materials and Methods

Fibroblasts from two patients were used in this study: patient SFC6 (genotype: c.633+1G > A/p.L445P) and patient SFC7 (genotype: c.372-2A > G/c.372-2A > G). The patients and the culture conditions were

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain. ³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain. *These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.G. (email: dgrinberg@ub.edu)

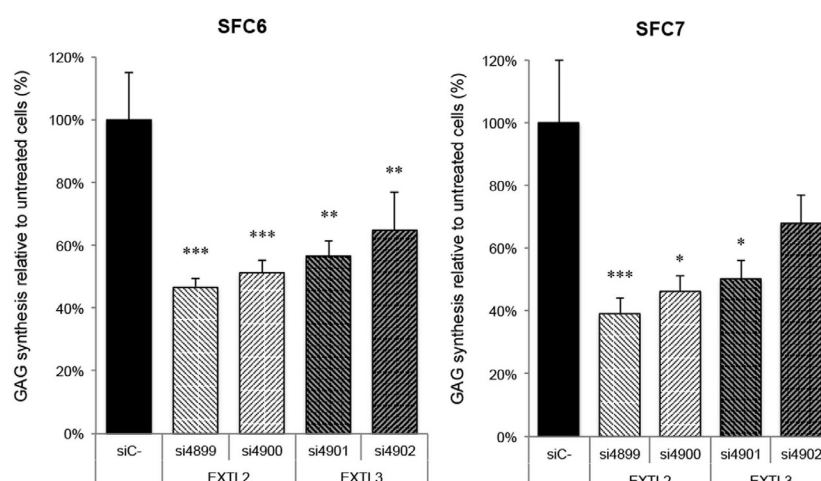


Figure 1. Inhibition of GAG synthesis. SFC6 and SFC7 fibroblasts were transfected with all four siRNAs and a negative control siRNA and after 3 days incorporation of ^{35}S sodium sulfate was analysed. Results for both patients are the mean $\pm$ standard error of three experiments performed in quadruplicate and are expressed as disintegrations per minute per μg of DNA. Differences between *EXTL* siRNAs with respect to negative control siRNA were evaluated using the non-parametric Mann-Whitney U test, and statistical significance was set at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***).

described in a previous work⁸. Fibroblasts were transfected with four different siRNAs using Lipofectamine 2000 as the transfection agent. Quantities of 5, 2.5 and 1.25 μl were used for 6-well, 12-well and 24-well plates respectively. Two Silencer[®] Select siRNAs (Ambion) for *EXTL2* (si4899 and si4900), two for *EXTL3* (si4901 and si4902) and one negative control (siC-) were used at a final concentration of 10 ηM . siRNA sequences are available on demand. Quantitative real-time PCR was performed using TaqMan[®] Gene Expression Assays for *EXTL2*, *EXTL3*, *HPRT* and *SDHA* genes, the last two as endogenous controls. PCRs were carried out in a LightCycler[®] 480 System (Roche). For every assay, the efficiency (E) of the reaction was calculated from a 7 points standard curve. The reaction efficiency was taken into account in the quantification cycle (Cq) calculation using LightCycler[®] 480 Software (release 1.5.0) (Roche). To confirm precision and reproducibility of real-time PCR the intra-assay precision was determined in 3 repeats within one LightCycler run. In the working conditions, the intra-assay coefficient of variation of all the assays at the working conditions was less than 1% and Cq standard deviation was smaller than 0.3.

The efficiency of GAG synthesis was quantified testing the cell incorporation of ^{35}S sodium sulfate from the medium as previously described⁶. The sulfated GAG storage was quantified using the Rheumera[®] Proteoglycan Detection Kit (Astarte Biologics) following the manufacturer's instructions. GAG extraction was performed as previously described⁹.

For heparan sulfate immunostaining, fibroblast cultures (untreated or treated as indicated above) were fixed in 4% PFA. Antibodies used were mouse anti-human HS (#H1890, 10E4 epitope, monoclonal antibody, USBiological) as a primary antibody, and donkey anti-mouse Cy2 (#715-225-150, polyclonal antibody, Jackson ImmunoResearch), as secondary antibody. For nucleus staining DAPI (Invitrogen) at 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used. The slides were mounted with PVA:DABCO mounting medium. Images were acquired with a Leica DMIRB fluorescence microscope and analyzed with the Fiji software¹⁰.

All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona and were conducted under the Declaration of Helsinki. Patients were encoded to protect their confidentiality, and informed consent obtained.

Results

Inhibition of *EXTL2* and *EXTL3* mRNA with specific siRNAs. All *EXTL* siRNAs were tested in fibroblasts from both patients and high inhibition levels were observed from day 3 to day 14 after transfection. All treated cells had expression levels of around 10% compared to cells treated with negative control siRNAs using *SDHA* as endogenous gene (Figure S1). Similar results were obtained with *HPRT* as endogenous gene (not shown).

Decrease in GAG synthesis. After three days of transfection, fibroblasts showed a decrease in the incorporation of ^{35}S sulfate of about 30% to 60% (depending on the siRNA used) compared to control samples (Fig. 1). Both patients showed similar results for each siRNA, indicating a more efficient inhibition of GAG synthesis for siRNAs designed to target the *EXTL2* gene (more than 50%) than in those targeting the *EXTL3* gene (less than 50%).

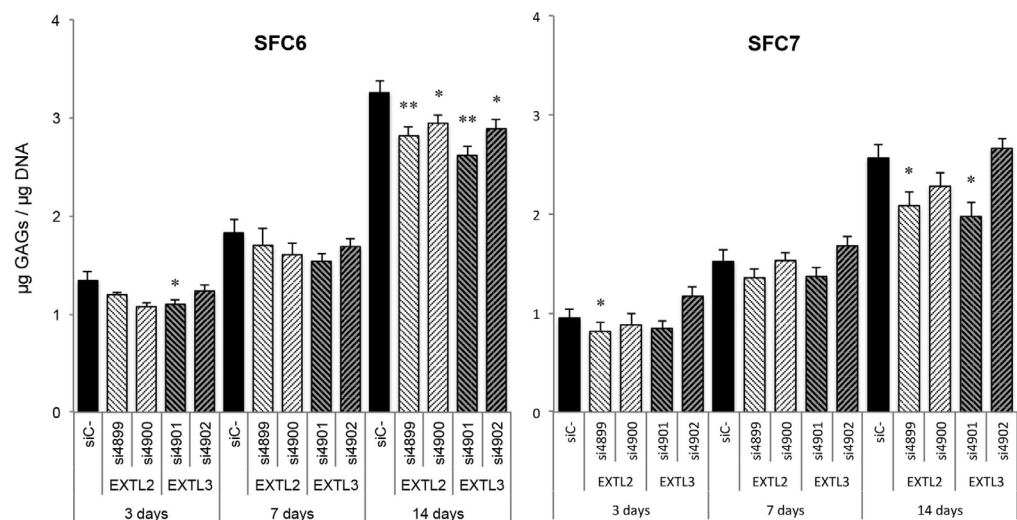


Figure 2. Decrease in GAG storage. SFC6 and SFC7 fibroblasts were transfected with all four siRNAs and a negative control siRNA and after 3, 7 and 14 days, GAG storage was analysed. Results for both patients are the mean $\pm$ standard error of three experiments performed in duplicate and are expressed in $\mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ at 3 days, 7 days and 14 days after transfection. Differences between *EXTL* siRNAs respect to negative control siRNA were evaluated using the non-parametric Mann-Whitney U test, and statistical significance was set at $p < 0.05$ (*) or $p < 0.01$ (**).

Decrease in GAG storage. Sulfated GAG storage was quantified in patients' fibroblasts after treatment (Fig. 2). After three days, SFC6 fibroblasts showed $1.346 \pm 0.085 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$, while treated fibroblasts presented between 1.075 and $1.235 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$. SFC7 fibroblasts had $0.953 \pm 0.049 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ without treatment, and between 0.812 and $1.168 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ after treatment. After seven days, SFC6 fibroblasts showed $1.824 \pm 0.136 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$, while treated fibroblasts presented between 1.538 and $1.701 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$. SFC7 fibroblasts had $1.521 \pm 0.081 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ without treatment and between 1.354 and $1.677 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ after treatment. After 14 days, SFC6 fibroblasts showed $3.259 \pm 0.085 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$, while treated fibroblasts presented between 2.618 and $2.945 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$. SFC7 fibroblasts had $2.569 \pm 0.049 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ without treatment and between 1.973 and $2.66 \mu\text{g GAGs}/\mu\text{g DNA}$ after treatment. In general, patients' storage decreased at each time point, reaching a maximum reduction of 24% for siRNA si4901 at 14 days in the fibroblasts of patient SFC7. GAG levels in WT fibroblasts were 0.796 ± 0.105 throughout the experiment.

Heparan sulfate storage was evaluated through immunocytochemistry. Clear differences between WT and patients' fibroblasts were observed after cells were fixed and stained with anti-HS antibodies (Fig. 3A). After a 3-day treatment with siRNA 4899 (as described above), patients' fibroblasts showed a clear reduction in HS accumulation (Fig. 3B,C). siRNA 4899 was chosen for this experiment because it was the one that gave the best results in the reduction of GAG synthesis (see Fig. 1).

Discussion

At present there is no effective treatment for Sanfilippo syndrome. In this report, different siRNAs were tested as SRT to inhibit key genes for HS synthesis in Sanfilippo C patients. A similar strategy has been applied previously, using shRNAs to inhibit *EXTL* genes⁷ and siRNAs to inhibit other genes participating in GAG synthesis⁶.

The siRNAs used in this study showed high mRNA inhibition capacity (around 90%) for as long as 14 days at low concentrations (10 nM). This is quite surprising, since we observed a relative loss of inhibition of the *GAPDH* gene (from 90% at day 3 to 60% at day 14, not shown). This long-lasting effect on the *EXTL* genes could be explained by their lower level of expression related to the *GAPDH* gene (less amount of siRNA would be enough to keep *EXTL* mRNA levels low). Besides, these new generation siRNAs are modified to achieve higher stability. Higher concentrations did not improve the result (data not shown), indicating the high efficiency of these siRNAs. These inhibition rates were higher than those previously obtained for the same genes with shRNAs⁷.

The results for GAG synthesis were interesting. After three days of transfection, all siRNAs achieved notable decreases in the synthetic pathway in both patients. Moreover, the reduction may have been even higher, considering that HS synthesis was inhibited but all types of GAG synthesis were quantified. Compared with previous results^{6,7}, the higher mRNA inhibition levels obtained here achieved greater GAG synthesis inhibition. Another important point to note is that *EXTL2* inhibition seemed to be more efficient in decreasing GAG synthesis both in our study and in the study by Kaidonis *et al.*⁷, suggesting

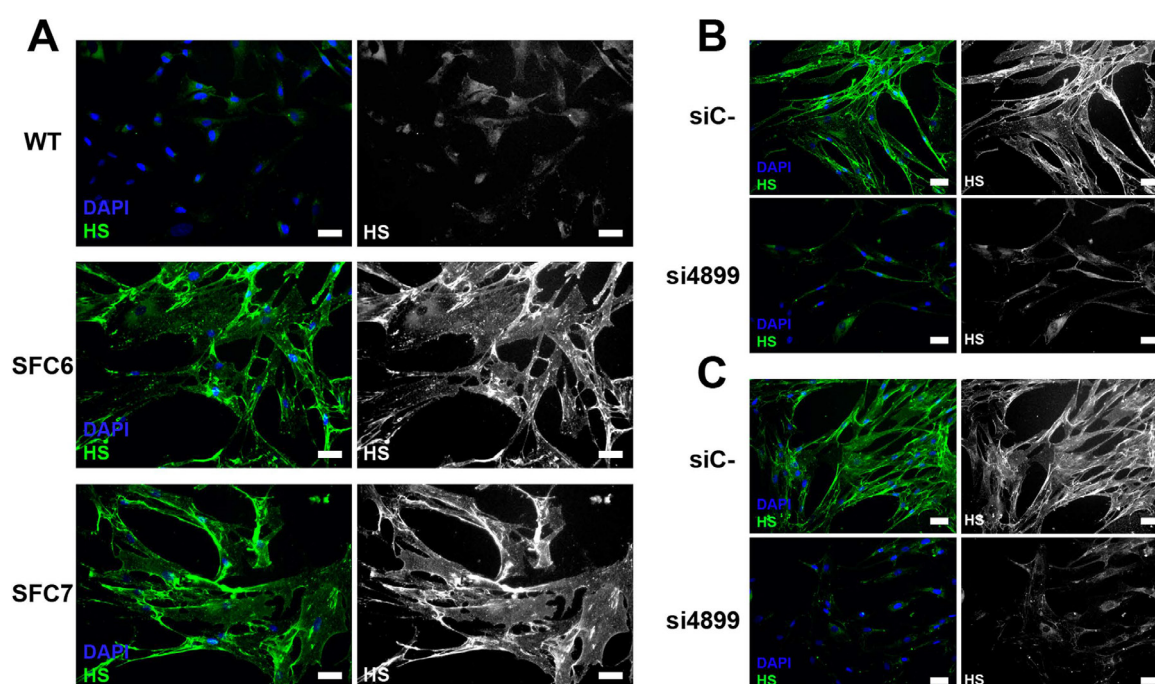


Figure 3. Heparan sulfate storage in WT and patients' fibroblasts. (A) Immunocytochemistry analysis of HS accumulation (green) in untreated WT and SFC6 and SFC7 cells, using a specific anti-HS antibody. The same images are shown using the white channel to highlight HS staining. Fibroblasts from patient SFC6 (B) and patient SFC7 (C) were transfected with si4899 and with a negative control siRNA (siC-) for three days. HS was detected as in A, and shown in the green and white versions. Bar = 20 μm.

that *EXTL2* may be a better target candidate. It should be noted that at 7 and 14 days after transfection GAG synthesis was decreased in untreated cells, probably due to the fact that they reached confluence, which may have promoted a decrease in the synthetic pathway of extracellular matrix components such as GAGs. It would be interesting to be able to work with more suitable cell types – neural cells, for example – which are highly relevant to this disease, and have lower growth rates that would allow long-term studies.

Patients' fibroblast cultures showed a pronounced increase in GAG storage with time, since these cells are not able to degrade HS. A slight decrease in storage has been detected after treatment with some of the siRNAs. The best results were observed at 14 days, although a trend towards a reduction was detected from three days of treatment onwards. We stress, again, that we decreased HS storage but quantified all GAG amounts, which may have led to an underestimation of the reduction. In this regard, when HS accumulation in the ECM was evaluated by immunocytochemistry, using HS-specific antibodies, a clear reduction of the accumulation was observed after three days of treatment.

Taken together, our results indicate that these siRNAs promote a reduction in mRNA levels of target genes, a notable reduction in the GAG synthetic pathway after 3 days, specifically of HS, as shown by immunocytochemistry, and a slower accumulation rate in patients' cells over two weeks. Although further research is needed, RNAi-based therapies is a promising approach, probably to be used as a complementary therapy to obtain synergic effects with other treatments in order to accelerate the rate of HS degradation and/or excretion out of the cell. The search for novel shRNAs, stable and highly inhibitory for *EXTL2* (the best target, according to our results and those of other authors) is a necessary next step on the way to achieving a successful SRT for Sanfilippo syndrome.

References

- Neufeld, E. F. & Muenzer, J. *The Mucopolysaccharidoses* in *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (eds. Scriver, C. R. *et al.*) 3421–3452 (McGraw-Hill, 2001).
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–33 (2011).
- Kreuger, J. & Kjellén, L. Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 898–907 (2012).
- Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
- Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
- Dziedzic, D., Wegrzyn, G. & Jakóbkiewicz-Banecka, J. Impairment of glycosaminoglycan synthesis in mucopolysaccharidosis type IIIA cells by using siRNA: a potential therapeutic approach for Sanfilippo disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 200–205 (2010).

7. Kaidonis, X. *et al.* Gene silencing of EXTL2 and EXTL3 as a substrate deprivation therapy for heparan sulphate storing mucopolysaccharidoses. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 194–199 (2010).
8. Canals, I. *et al.* Molecular analysis of Sanfilippo syndrome type C in Spain: seven novel HGSNAT mutations and characterization of the mutant alleles. *Clin. Genet.* **80**, 367–374 (2011).
9. Barbosa, I. *et al.* Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* **13**, 647–653 (2003).
10. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).

Acknowledgements

We thank L. Gort and M. Bosch for advice in setting up some techniques. The authors are also grateful for the support of the *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras* (CIBERER), which is an initiative of the ISCIII. This study was partially funded by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2011-25431) and from the Catalan Government (2009SGR971 and 2014SGR932). We are also grateful for the permanent support, including financial aid, from ‘patient-support’ associations, such as Jonah’s Just Begun-Foundation to Cure Sanfilippo Inc. (USA), Association Sanfilippo Sud (France), Fundación Stop Sanfilippo (Spain), Asociación MPS España (Spain). IC was supported by a grant from the University of Barcelona (APIF), Spain.

Author Contributions

I.C. was involved in the conception and design of the study, performed most of the experimental work, the analysis and interpretation of the data, and participated in the drafting and revising of the manuscript. N.B. performed the immunocytochemistry experiments. M.C. participated in the performance of the experimental work. D.G. and L.V. supervised all the research, contributing critically to the design of the work and data interpretation as well as in the revision of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Canals, I. *et al.* EXTL2 and EXTL3 inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome. *Sci. Rep.* **5**, 13654; doi: 10.1038/srep13654 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

***EXTL2* and *EXTL3* inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome.**

Isaac Canals^{1,2,3}, Noelia Benetó^{1,2,3}, Mónica Cozar^{1,2,3}, Lluïsa Vilageliu^{1,2,3*}, Daniel Grinberg^{1,2,3*#}.

¹ Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain

³ Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

* Co-last authors.

Corresponding author (dgrinberg@ub.edu)

Supplementary material

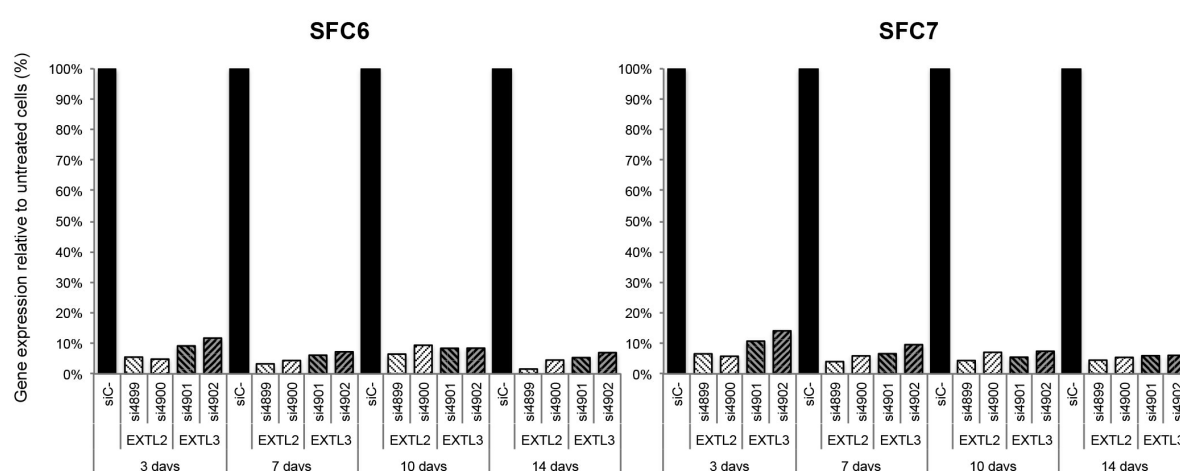


Figure S1 *EXTL2* and *EXTL3* gene silencing. SFC6 and SFC7 fibroblasts were transfected with all four siRNAs and a negative control siRNA, and after 3, 7, 10 and 14 days, gene expression was analysed by real-time PCR. Results are expressed as the percentage of gene expression compared to cells transfected with the negative control siRNA and using two different reference genes (*HPRT* and *SDHA*).

Artículo 2

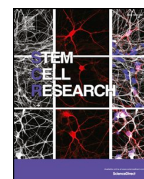


Generation of two compound heterozygous *HGSNAT*-mutated lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo C syndrome

Noelia Benetó, Mónica Cozar, María García-Morant, Edgar Creus-Bachiller,
Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg, Isaac Canals

Resumen

El síndrome de Sanfilippo C (mucopolisacaridosis IIIC) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico poco frecuente causada por mutaciones en el gen *HGSNAT*. Se caracteriza por una neurodegeneración progresiva y severa, para la cual no hay tratamiento disponible. Aquí hemos generado dos líneas celulares mutadas en el gen *HGSNAT* a partir de una línea de células madre pluripotentes inducidas derivadas de humanos sanos (hiPSC) usando la edición CRISPR/Cas9. Estas nuevas líneas celulares tienen un cariotipo normal, expresan marcadores específicos de pluripotencia y tienen la capacidad de diferenciarse a las tres capas embrionarias *in vitro*. Estas líneas hiPSC serán útiles para la generación de modelos *in vitro* del síndrome de Sanfilippo C.



Lab Resource: Multiple Cell Lines

Generation of two compound heterozygous *HGSNAT*-mutated lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo C syndrome

Noelia Benetó^a, Monica Cozar^a, María García-Morant^a, Edgar Creus-Bachiller^a, Lluïsa Vilageliu^a, Daniel Grinberg^{a,*}, Isaac Canals^{b,*}

^a Department Genetics, Microbiology and Statistics, Fac. Biology, University of Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Spain

^b Stem Cells, Aging and Neurodegeneration Group, Lund Stem Cell Center, University Hospital, Lund, Sweden

Sanfilippo C syndrome (Mucopolysaccharidosis IIIC) is a rare lysosomal storage disorder caused by mutations in the *HGSNAT* gene. It is characterized by a progressive and severe neurodegeneration, for which there is no treatment available. Here, we report the generation of two *HGSNAT*-mutated cell lines from a healthy human induced pluripotent stem cell (hiPSC) line using CRISPR/Cas9 editing. These novel cell lines have a normal karyotype, express pluripotency specific markers and have the capability to differentiate into all three germ layers *in vitro*. These hiPSC lines will be useful for the generation of *in vitro* models of Sanfilippo C syndrome.

Resource Table

Unique stem cell lines identifier	UBi001-A-1 and UBi001-A-2
Alternative names of stem cell lines	HGSNAT1 (UBi001-A-1) HGSNAT2 (UBi001-A-2)
Institution	University of Barcelona (Barcelona, Spain) and Lund Stem Cell Center (Lund, Sweden)
Contact information of distributor	Isaac Canals – isaac.canals@med.lu.se Daniel Grinberg – dgrinberg@ub.edu
Type of cell lines	Induced pluripotent stem cell line
Origin	Human
Cell Source	Healthy human induced pluripotent stem cell line. Male, 46XY (UBi001-A)
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Retrovirus (the original iPSC line) (Canals et al., 2015)
Multiline rationale	Isogenic clones
Gene modification	YES
Type of modification	CRISPR/Cas9-mediated indels
Associated disease	Sanfilippo C syndrome
Gene/locus	<i>HGSNAT</i> /8p11.21-p11.1
Method of modification	CRISPR/Cas9
Name of transgene or resistance	N/A
Inducible/constitutive system	N/A
Date archived/stock date	31st July 2019

Cell line repository/bank

UBi001-A: <https://hpscereg.eu/cell-line/UBi001-A>
UBi001-A-1: <https://hpscereg.eu/cell-line/UBi001-A-1>
UBi001-A-2: <https://hpscereg.eu/cell-line/UBi001-A-2>

Ethical approval

Institutional Review Board (IRB00003099) of
the Bioethical Commission of the University of
Barcelona (October 20, 2016)

1. Resource utility

Mutations in the heparan- α -glucosaminide N-acetyltransferase (*HGSNAT*) gene cause Sanfilippo C syndrome. The *HGSNAT* mutated cell lines generated in this work can be used together with the isogenic control line for disease modelling. These lines can also be useful for drug screening to identify potential therapeutic approaches for Sanfilippo C syndrome.

2. Resource details

The *HGSNAT* gene codes a protein involved in heparan sulfate (HS) degradation, a glycosaminoglycan present in the extracellular matrix. Defects in *HGSNAT* lead to abnormal HS degradation and its storage inside the lysosomes, resulting in malfunction of the endolysosomal system and causing Sanfilippo C syndrome, a rare lysosomal storage disorder. This disease is characterized by a severe and progressive neurodegeneration for which there is no treatment available for patients.

Here, we targeted exon 2 of the *HGSNAT* gene in a previously reported healthy hiPSC line (UBi001-A) (Canals et al., 2015) to generate mutated hiPSC lines using CRISPR/Cas9 gene-editing system (Fig. 1A). We used the ribonucleoprotein Cas9 together with a sgRNA targeting *HGSNAT* exon 2 to disrupt the gene by non-homologous end joining (NHEJ). The UBi001-A hiPSC was transfected with the complex Cas9 protein – sgRNA. After

* Corresponding authors.

E-mail address: isaac.canals@med.lu.se (I. Canals).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101616>

Received 1 August 2019; Received in revised form 3 October 2019; Accepted 10 October 2019

Available online 24 October 2019

1873-5061/ © 2019 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

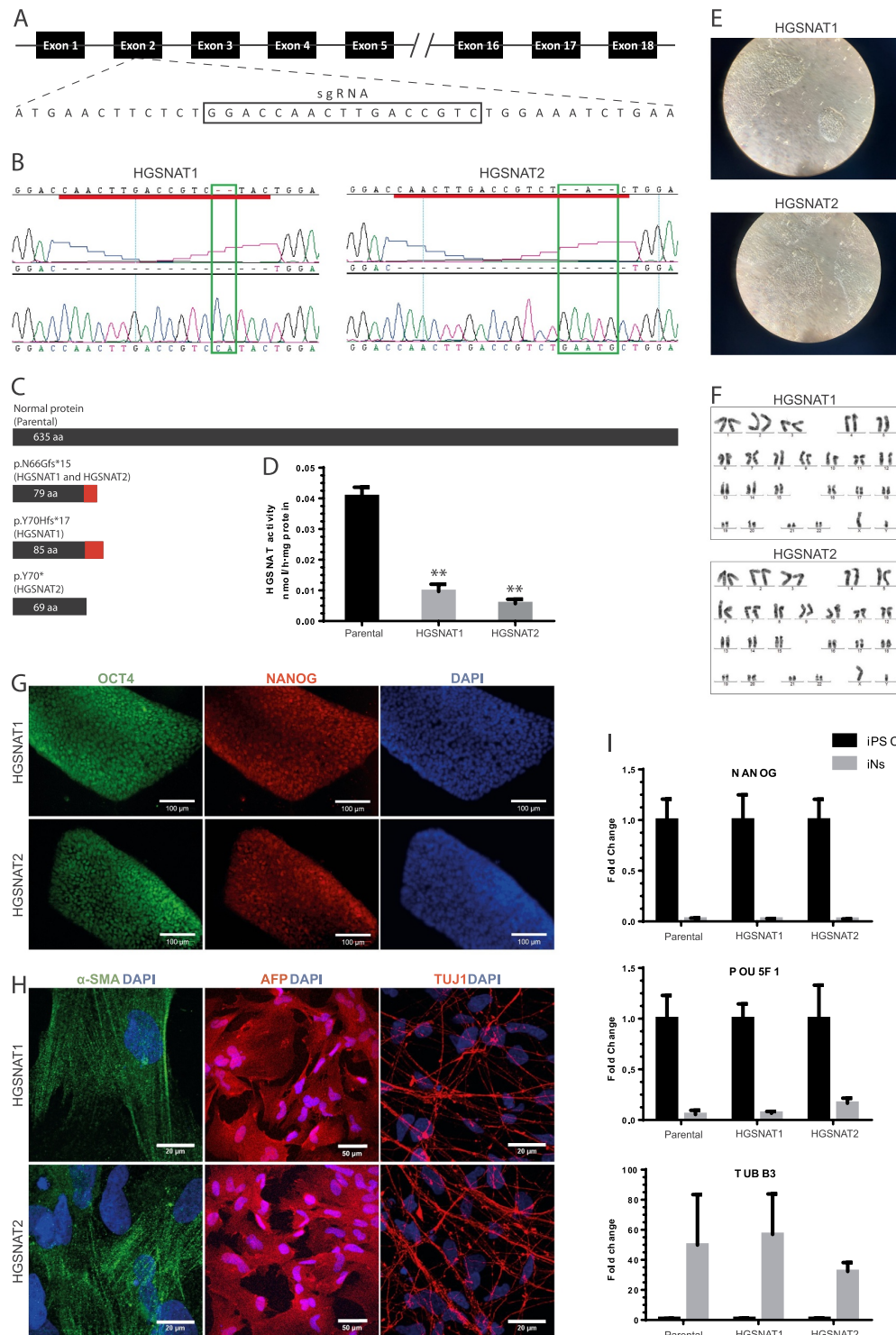


Fig. 1. Characterization of HGSNAT-mutated iPSC lines UBi001-A-1 (HGSNAT1) and UBi001-A-2 (HGSNAT2). **A)** Illustration showing CRISPR/Cas9 strategy for the HGSNAT gene, with the sgRNA targeting exon-2. **B)** Sanger-sequencing and alignment of both mutated cell lines, showing deletions (in red) and insertions (in green). **C)** Scheme of the different resultant proteins, illustrating aminoacids in frame (black) and those after the frameshift (red). **D)** HGSNAT activity levels in the different iPSC lines, expressed in nmol/h·mg protein. **E)** Representative bright-field images showing typical stem cell morphology ($\times 4$ objective). **F)** Results of the karyotype analysis for both cell lines. **G)** Representative images of the Immunofluorescence staining for pluripotency markers OCT4 and NANOG, and DAPI for nuclei. Scale bar = 100 μ m. **H)** *In vitro* differentiation assay to the three germ layers: α -SMA (mesoderm, scale bar = 20 μ m), AFP (endoderm, scale bar = 50 μ m) and TUJ1 (ectoderm, scale bar = 20 μ m). **I)** Real-time quantitative PCR analysis showing expression of pluripotent genes POU5F1 (OCT4) and NANOG, and neural marker TUBB3, normalized to GAPDH expression both in iPSC lines (iPSCs) and induced neurons (iNs). Results are represented as the fold change in gene expression of iNs compared to iPSC.

Table 1
Summary of lines.

iPSC line names	Abbreviation in figures	Gender	Age	Ethnicity	Genotype of locus	Disease
UBi001-A-1	HGSNAT1	Male	N/A	Caucasian	<i>HGSNAT</i> c.195_210del (p.N66Gfs*15)/c.207_208insCA (p.Y70Hfs*17)	Sanfilippo C syndrome
UBi001-A-2	HGSNAT2	Male	N/A	Caucasian	<i>HGSNAT</i> c.195_210del (p.N66Gfs*15)/c.209delinsGAATG (p.Y70*)	Sanfilippo C syndrome

48–72 h, sorted single cells were plated into laminin-coated 96-well plates for single cell culture and expansion. To analyse colony genotypes, genomic DNA was isolated and the regions flanking the targeted exon 2 were amplified by PCR, followed by DNA sequencing.

First, a heterozygous line with a normal allele and bearing a 16 bp deletion in the other allele was obtained (c.195_210del or p.N66Gfs*15). That deletion included the sgRNA target sequence, which protected the allele for being targeted again. We used the heterozygous line to generate two new lines in a second round of targeting; one, UBi001-A-1 with a 2 bp insertion in the other allele (c.207_208insCA or p.Y70Hfs*17) and another one, UBi001-A-2 with a complex rearrangement, including a deletion of 1 bp and an insertion of 5 bp (c.209delinsGAATG or p.Y70*) (Fig. 1B, 1C and Table 1). All different mutations caused frameshifts that changed the open reading frame in *HGSNAT* reducing its enzyme activity (Fig. 1D) into values similar to patient-derived iPSC lines (Canals et al., 2015). The two compound heterozygous cell lines obtained were further characterized.

The presence, size and exact sequence of the mutations in separated alleles were demonstrated by cloning and amplification of the mutated region in a pGEM-T plasmid and posterior sequencing (Fig. 1B). All mutations in UBi001-A-1 and UBi001-A-2 caused frameshift in the open reading frame of *HGSNAT* (Fig. 1C). Both cell lines had a normal stem cell-like morphology (Fig. 1E) normal karyotype (Fig. 1F), and were mycoplasma free. The expression of pluripotent markers OCT4 (aka POU5F1) and NANOG was confirmed by immunocytochemistry (Fig. 1G). Furthermore, cell lines retained their potential to differentiate into the three germ layers as showed by immunocytochemistry (Fig. 1H). After performing RT-qPCR, we confirmed that both mutated hiPSC lines expressed higher levels of pluripotency markers *NANOG* and *OCT4* when compared with induced neurons (iNs) derived from the same hiPSC, which instead expressed higher levels of *TUJ1* (aka *TUBB3*) (Fig. 1I). Short tandem repeat (STR) analysis confirmed that both cell lines, UBi001-A-1 and UBi001-A-2, had their origin from its hiPSC parental cell line (UBi001-A) (listed on Fig. S1B). Finally, we performed sequencing analyses for the top-five predicted off-target sites of the sgRNA used, confirming that no other editings were present (Fig. S1A).

3. Materials and methods

3.1. Cell culture

All hiPSC were cultured in StemFlex Medium (#A3349401, Gibco) with 0.5% Penicillin Streptomycin (P/S, #15140-122, Gibco) on Biolaminin 521 (#LN521, BioLamina) coated plates and maintained at 37 °C in humidified air with 5% CO₂. Cells were passaged with StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (#A1110501, Gibco) every 3–4 days, plating 2×10^4 cells/cm², around 1:5 split ratio. To improve survival rate, 2 μM Thiazovivin (#72252, STEMCELL Technologies) were added to the medium for 24 h after plating.

3.2. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout

5×10^4 healthy hiPSC were plated per well in Biolaminin 521-coated 24-well plates with 10 μM Y-27632 (#72302, STEMCELL

Technologies) in StemFlex medium with P/S for 24 h. Then, attached cells were transfected with an *in vitro* complex formed by the TrueCut Cas9 Protein v2 (#A36497, Invitrogen) and a pre-designed TrueGuide sgRNA Modified (AssayID: CRISPR718654_SGM, #A35511, Invitrogen) using Lipofectamine Stem Transfection Reagent (#STEM00001, Invitrogen). 48–72 h after transfection, cells were collected and replated by cell sorting as single cells onto Biolamina 521-coated 96-well plates in the presence of 10 μM Y-27632. The resulting colonies were amplified and a portion of cells of each colony was collected for PCR amplification and sequencing (Table 3).

3.3. Karyotyping, STR analysis and mycoplasma detection

UBi001-A-1 and UBi001-A-2 at passage 13 and 10 after transfection, respectively, were prepared for karyotype analysis. Colcemid (#15212-046, Invitrogen) was added to a final concentration of 2 ng/ml during 45 min. The cells were harvested with StemPro Accutase. 20 metaphase spreads were counted for each cell line in the karyotyping analysis, which was carried out by AMBAR (Anàlisis Mèdiques Barcelona). For STR analysis, 16 different loci (listed on Fig. S1B) were analysed on gDNA (DNeasy Blood & Tissue Kit #69504, Qiagen) by AMBAR. Cell culture supernatants were analysed using a Mycoplasma Detection Kit (#4542, Biotools) following the manufacturer's instructions.

3.4. HGSNAT activity

Enzyme activity was measured as described in (Canals et al., 2011).

3.5. Embryonic body (EB) formation and in vitro differentiation

EBs formation and three germ layers differentiation was performed as in (Canals et al., 2015), but hiPSC were maintained in StemFlex medium with P/S during this EB formation, and Thiazovivin was added from the day hiPSC were distributed in 96-well plates with V bottom until 2–3 days after, when EBs were put in suspension.

3.6. Immunofluorescence staining

Cells were fixed in 4% PFA for 15 min, blocked and permeabilised with TBS containing 0.1% Triton-X 100 (#28817.295, VWR) and 5% normal donkey serum (#S30-100 M, Merck Millipore) (TBS + +) for 2 h at room temperature. Primary antibodies (Table 3) were incubated for overnight at 4 °C. Then, secondary antibodies (Table 3) were incubated 2 h at room temperature. Nuclei were stained with 0.5 μg/ml DAPI (#D1306, Invitrogen). Both antibodies and DAPI were diluted in TBS + +. Slides were mounted with MOWIOL mounting medium (#475904, Millipore). iPSC images were acquired with ZOE Fluorescence Cell Imager (Bio Rad), images from EBs differentiated into ectoderm (TUJ1) and mesoderm (α-SMA) were acquired using Zeiss confocal microscope LSM 880, and images from EBs differentiated into endoderm (AFP) were acquired using Leica confocal TCS-SP2 microscope. All images were analysed with the Fiji software (Schindelin et al., 2012).

Table 2
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography	Normal	Figure 1 Panel E
Phenotype	Qualitative analysis (Immunocytochemistry)	Positive for pluripotency markers: OCT3/4 and NANOG	Figure 1 Panel G
	Quantitative analysis (RT-qPCR)	Relative expression of pluripotency markers: positive for OCT3/4 and NANOG	Figure 1 Panel I
Genotype	Karyotype (G-banding) and resolution	46 XY, Resolution 550-650	Figure 1 Panel F
Identity	Microsatellite PCR (mPCR) OR STR analysis	Not performed	
		16 loci tested, 100% matched	Available with the authors
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	Compound heterozygous mutation in both cases	Figure 1 Panel B
	Off-target analysis	Top 5 predicted off-target analysed and all sequence were correct	Supplementary Figure 1 Panel A
Microbiology and virology	Mycoplasma	Negative	Supplementary Figure 1 Panel C
Differentiation potential	Embryoid body formation and differentiation	Endoderm: α -feto protein (AFP), mesoderm: muscle actin (α -SMA), and ectoderm: β -tubulin (TUB1).	Figure 1 Panel H
Donor screening (OPTIONAL)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	Not performed	
Genotype additional info (OPTIONAL)	Blood group genotyping	Not performed	
	HLA tissue typing	Not performed	

3.7. Direct neural differentiation

Neural induction with Ngn2 overexpression was carried out as previously described (Zhang et al., 2013). Six days after induction, induced neurons (iNs) were re-plated on a Matrigel-coated 6-well plate and 10 days after induction, RNA was extracted using High Pure RNA Isolation Kit (#11828665001, Roche).

3.8. Real-time PCR analysis

RNA was isolated as described above, and 2 μ g of total RNA was used to synthesize cDNA, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (#4368814, Applied Biosystems) and the RNase Inhibitor (#N8080119, Applied Biosystems), following manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed in LightCycler 480 II

(Roche) system with a LightCycler 480 Probes Master (#04887301001, Roche). *GAPDH* probe was used as a normaliser. TaqMan probes are listed in Table 3.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome. We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no

Table 3
Reagents details

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency Markers	Mouse anti-OCT3/4	1:100	Santa Cruz Biotechnology #sc-5279, RRID: AB_628051
	Rabbit anti-NANOG	1:100	Abcam #ab21624, RRID: AB_446437
Differentiation Markers	Rabbit anti-AFP	1:100	DakoCytomation (now part of Agilent) #A0008, RRID: AB_2650473
	Mouse anti-SMA	1:100	Sigma-Aldrich #A5228, RRID: AB_262054
	Rabbit anti-TUJ1	1:500	Covance #MRB-435P, RRID: AB_663339
Secondary antibodies	Donkey anti-mouse Cy2	1:200	Jackson ImmunoResearch #715-225-150, RRID: AB_2340826
	Donkey anti-rabbit Cy3	1:200	Jackson ImmunoResearch #711-165-152, RRID: AB_2307443
Primers			
	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Targeted mutation	HGSNAT	GGAAGCAACTGTTACACGA/ CATCCCTGAGAACTGGCTTT	
Potential off-target	POT1: CTGGTAGACGGTCAGTCTGGTCC	GTTGAGGTAAGGCAAGCAAAA/ CAGTTCAAACAGATTAGGTCC	
	POT2: CCGGGAGACGGTCAAGTTGGGGT	CCCCACATATTACCCACGAG/ GCGAGAGACACACAAAGAAC	
	POT3: GTAGACGGTCTGTGGGGCC	GCATTATCCCAGACAACTCTG/ GAGAAGTTGGAACGACTATTTA	
	POT4: CTGGTACACGGTGAAC TTGGTCT	AAGCGGTTGTTCTCCAAATG/ CCTGTCTGCATCCTCACTCA	
	POT5: GGACTGACTGGACCGTCTGC	GATTGGGATCTGAGCGGAC/ AAGGGCAAAGTGTGTGGAC	
Probes for RT-qPCR			
	Target	Assay ID (#4331182, TaqMan)	
Pluripotency markers	NANOG	Hs02387400_g1	
	POU5F1 (OCT3/4)	Hs01654807_s1	
Neural marker	TUJ1	Hs00801390_s1	
House Keeping	GAPDH	Hs99999905_m1	

impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.scr.2019.101616](https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101616).

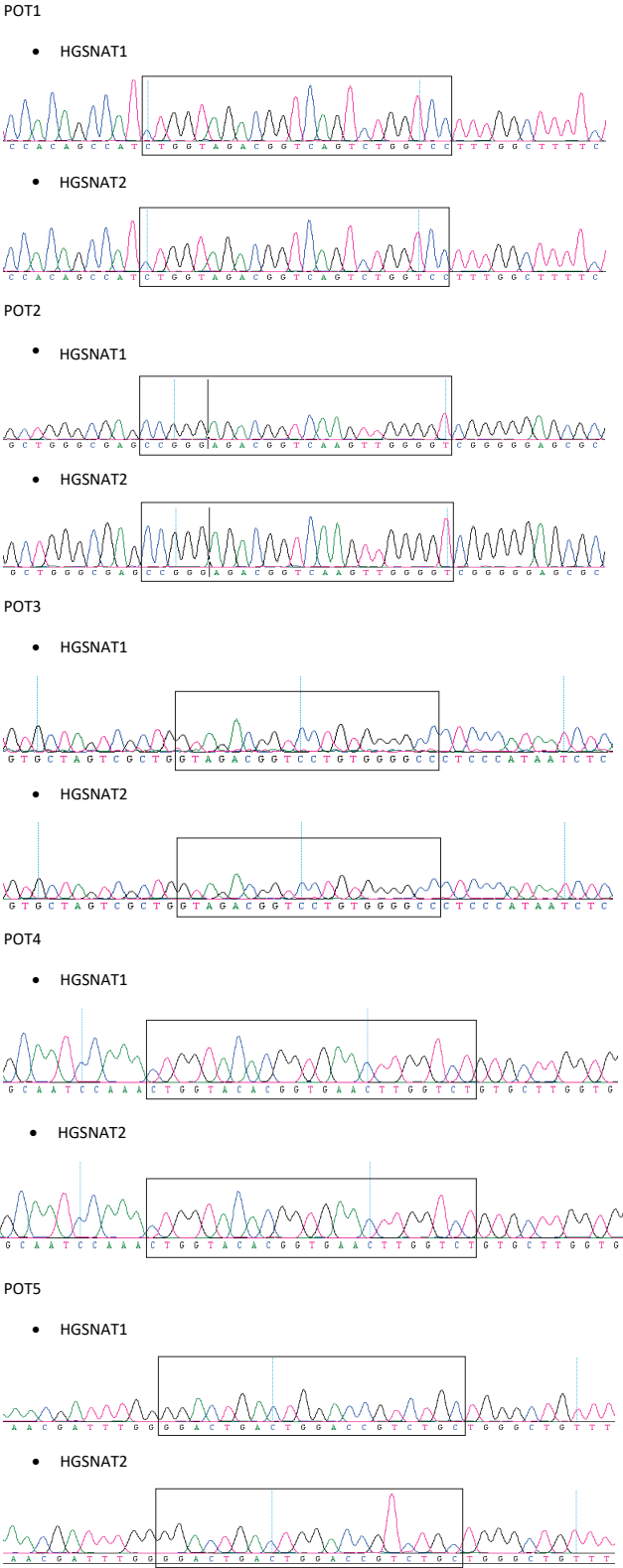
References

Canals, I., Elalaoui, S.C., Pineda, M., Delgadillo, V., Szlago, M., Jaouad, I.C., ... Vilageliu,

L., 2011. Molecular analysis of Sanfilippo syndrome type C in Spain: seven novel HGSNAT mutations and characterization of the mutant alleles. *Clin. Genet.* 80 (4), 367–374. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01525.x>.
Canals, I., Soriano, J., Orlandi, J.G., Torrent, R., Richaud-Patin, Y., Jiménez-Delgado, S., ... Raya, A., 2015. Activity and high-order effective connectivity alterations in Sanfilippo C patient-specific neuronal networks. *Stem. Cell. Rep.* 5 (4), 546–557. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.016>.
Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., ... Südhof, T.C., 2013. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* 78 (5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.029>.

Supplementary material. Figure S1.

A



B

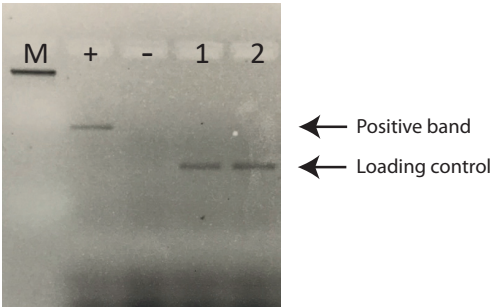
Loci tested in STR analysis

Genetic markers	Chromosomal location
D8S1179	8
D21S11	21q11.2-q21
D7S820	7q11.21-22
CSF1PO	5q33.3-34
D3S1358	3p
TH01	11p15.5
D13S317	13q22-31
D16S539	16q24-qter
D2S1338	2q35-37.1
D19S433	19q12-13.1
VWA	12p12-pter
TPOX	2p23-2per
D18S51	18q21.3
D5S818	5q21-31
FGA	4q28
AMELOGENIN*	X: p22.1-22.3 Y: p11.2

*Amelogenin: Result related with gender: XX (female); XY (male)

C

Mycoplasma detection



Artículo 3



Neuronal and astrocytic differentiation from Sanfilippo C syndrome iPSC for disease modeling and drug development

Noelia Benetó, Monica Cozar, Laura Castilla-Vallmanya, Oskar G. Zetterdahl, Madalina Sacultanu, Eulalia Segur-Bailach, María García-Morant, Antonia Ribes, Henrik Ahlenius, Daniel Grinberg, Lluïsa Vilageliu, Isaac Canals

Resumen

El síndrome de Sanfilippo tipo C (mucopolisacaridosis IIIC) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico neurodegenerativo de inicio temprano, que actualmente no dispone de tratamiento. La gran mayoría de los estudios centrados en los mecanismos de la enfermedad del síndrome de Sanfilippo se realizaron en células no neurales o modelos de ratón, que presentan limitaciones obvias. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) son una forma eficiente de modelar enfermedades humanas *in vitro*. Los protocolos de diferenciación basados en factores de transcripción recientemente desarrollados permiten la conversión rápida y eficiente de iPSCs en el tipo celular de interés. Al aplicar estos protocolos, hemos generado nuevos modelos neuronales y astrocíticos del síndrome de Sanfilippo utilizando nuestras líneas de iPSCs de enfermedades previamente establecidas. Además, nuestro modelo neuronal exhibe fenotipos moleculares específicos de la enfermedad, como el aumento de lisosomas y heparán sulfato. Por último, probamos un tratamiento experimental basado en siRNAs que previamente demostró ser exitoso en los fibroblastos de los pacientes, y demostró su falta de eficacia en las neuronas. Nuestros hallazgos resaltan la necesidad de usar modelos celulares humanos relevantes para probar intervenciones terapéuticas y muestran la aplicabilidad de nuestros modelos neuronales y astrocíticos del síndrome de Sanfilippo para futuros estudios sobre mecanismos de enfermedad y desarrollo de fármacos.



Article

Neuronal and Astrocytic Differentiation from Sanfilippo C Syndrome iPSCs for Disease Modeling and Drug Development

Noelia Benetó ¹, Monica Cozar ¹, Laura Castilla-Vallmanya ¹, Oskar G. Zetterdahl ²,
Madalina Sacultanu ², Eulalia Segur-Bailach ³, María García-Morant ¹, Antonia Ribes ³,
Henrik Ahlenius ², Daniel Grinberg ¹, Lluïsa Vilageliu ¹ and Isaac Canals ^{2,*}

¹ Department Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, E-08028 Barcelona, Spain; noeliabg92@gmail.com (N.B.); monicacozar@ub.edu (M.C.); lcastilla30@gmail.com (L.C.-V.); mg_morant@hotmail.com (M.G.-M.); dgrinberg@ub.edu (D.G.); lvilageliu@ub.edu (L.V.)

² Stem Cells, Aging and Neurodegeneration Group, Department of Clinical Sciences, Neurology, Lund Stem Cell Center, Lund University, SE-22184 Lund, Sweden; oskar.zetterdahl@med.lu.se (O.G.Z.); madalina.sacultanu@med.lu.se (M.S.); henrik.ahlenius@med.lu.se (H.A.)

³ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clinic de Barcelona, CIBERER, IDIBAPS, E-08028 Barcelona, Spain; laiasegur@gmail.com (E.S.-B.); ARIBES@clinic.cat (A.R.)

* Correspondence: isaac.canals@med.lu.se; Tel.: +46-46-222-05-15

Received: 31 January 2020; Accepted: 26 February 2020; Published: 28 February 2020

Abstract: Sanfilippo syndrome type C (mucopolysaccharidosis IIIC) is an early-onset neurodegenerative lysosomal storage disorder, which is currently untreatable. The vast majority of studies focusing on disease mechanisms of Sanfilippo syndrome were performed on non-neuronal cells or mouse models, which present obvious limitations. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are an efficient way to model human diseases in vitro. Recently developed transcription factor-based differentiation protocols allow fast and efficient conversion of iPSCs into the cell type of interest. By applying these protocols, we have generated new neuronal and astrocytic models of Sanfilippo syndrome using our previously established disease iPSC lines. Moreover, our neuronal model exhibits disease-specific molecular phenotypes, such as increase in lysosomes and heparan sulfate. Lastly, we tested an experimental, siRNA-based treatment previously shown to be successful in patients' fibroblasts and demonstrated its lack of efficacy in neurons. Our findings highlight the need to use relevant human cellular models to test therapeutic interventions and shows the applicability of our neuronal and astrocytic models of Sanfilippo syndrome for future studies on disease mechanisms and drug development.

Keywords: sanfilippo syndrome; mucopolysaccharidosis III; lysosomal storage disorders; induced pluripotent stem cells; neuronal differentiation; astrocyte differentiation; transcription factor-based differentiation; lysosomes; siRNAs; substrate reduction therapy

1. Introduction

Lysosomal storage disorders (LSDs) are a group of rare inherited metabolic diseases caused by deficiencies in lysosomal enzymes leading to impaired recycling of macromolecules and alteration of the endolysosomal system [1]. Mucopolysaccharidoses (MPS), one type of LSD, arise from mutations in the genes responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs), which accumulate within the lysosomes. Among MPS, Sanfilippo syndrome (also known as mucopolysaccharidosis III

or MPS III) is the most frequent form and is characterized by the incomplete degradation of one specific GAG known as heparan sulfate (HS). At the cellular level, partially degraded HS accumulates inside the lysosomes of several organs and tissues [2–4]. Four different Sanfilippo syndrome subtypes are recognized depending on the mutated gene and consequent enzyme deficiency: type A (OMIM#252900), type B (OMIM#252920), type C (OMIM#252930), and type D (OMIM#252940). Patients from all four subtypes show similar clinical symptomatology, mainly characterized by an early-onset severe and progressive neurodegeneration accompanied by mild somatic symptoms [2–4]. The incidence of all Sanfilippo syndrome subtypes is around 1 in 70,000 live births, with a prevalence of 1 to 9 in 1,000,000 people depending on the studied population. Prevalence of the different subtypes vary between populations (i.e., subtype A is more frequent in the north of Europe while subtype B is more frequent in southern Europe [5]). Sanfilippo syndrome type C is caused by a deficiency in an enzyme located in the lysosomal membrane, heparan- α -glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT, EC 2.3.1.78) [6], which is encoded by the *HGSNAT* gene. This gene is in the pericentromeric region of chromosome 8 (8p11.2–8p11.1) and has 18 exons [7,8]. The HGSNAT protein has 635 amino acids and 11 transmembrane domains [9]. Sanfilippo syndrome type C presents a prevalence of 1 in 1,500,000 live births, accounting for approximately 4% of all Sanfilippo syndrome cases worldwide [3]. First neurological symptoms appear at an early age (commonly within 3 to 7 years of age) and patient life expectancy spans from 10 to 30 years [3].

To date, there is no treatment for the neurological symptoms of Sanfilippo syndrome, and management of these patients consists of palliative measures. For non-neurological LSDs, enzyme replacement therapy has been proven to be the most successful strategy [10]; however, the blood–brain barrier limits availability of the enzyme in the brain and intrathecal administration, besides being a very invasive strategy, did not promote neurocognitive benefits in most Sanfilippo patients in a recent clinical trial [11]. Similarly, therapies using hematopoietic stem cell transplantation before disease onset, although useful for treating somatic symptoms, are not effective to prevent neurodegeneration in patients [12]. Alternatively, the use of pharmacological chaperones to improve the correct folding and stability of the defective protein has been approved for some LSDs [13]. For Sanfilippo syndrome type C, promising results were shown using glucosamine in patients' fibroblasts [14], but its efficiency in brain cells and its ability to cross the blood–brain barrier remains to be assessed. Gene therapy is an optimal therapeutic option for LSDs since it has been proposed that increases around 10% in enzymatic activity are sufficient to produce clinical benefits in patients [10]. In the case of Sanfilippo syndrome types A and B, two clinical trials based on intracerebral injection of adeno-associated virus (AAV) showed some neurological improvements in patients [15,16]. However, it is important to note that successful gene therapy for lysosomal enzymes relies on the ability of transduced cells to share the correct lysosomal enzyme with non-transduced neighboring cells through 6-mannose phosphate receptors [17]. Considering that HGSNAT is a lysosomal transmembrane protein that does not shuttle through the 6-mannose phosphate pathway, Sanfilippo C syndrome might not be the best candidate for this therapeutic strategy. Nonetheless, some promising results have been obtained in a mouse model using a novel AAV with a modified capsid [18]. Another interesting therapeutic approach for LSDs is substrate reduction therapy (SRT) to decrease the synthesis of the molecule that cannot be correctly degraded. For Sanfilippo syndrome, rhodamine B and genistein have shown good results in fibroblasts or animal models [19–21], however, those results did not translate in clear neurological benefits for patients [22]. A different SRT approach consists in the use of RNA interference (RNAi) to inhibit genes responsible for GAG synthesis. Patients' fibroblasts treated with siRNAs or shRNAs against two genes involved in HS synthesis showed a clear reduction in GAG production [23–25] and HS storage [25]. However, given the neurological symptoms seen in patients, it is crucial to study SRT in relevant human neural cells.

For many years, human culture systems were limited to the use of immortalized cell lines with genetic and epigenetic aberrations as well as unstable karyotypes or primary cells from patients, which are very difficult to obtain [26]. Moreover, patient cells are usually derived from postmortem material, which represents the end stage of the disease and does not allow studies on early disease-related alterations. Fibroblasts are often used as human cellular models in LSDs, but there are

significant differences between fibroblasts and neural cell types. All these aspects accentuate the importance of generating new relevant cell models to investigate the underlying mechanisms of disease. The discovery of strategies to reprogram somatic cells back to pluripotency [27] has created several opportunities for generating in vitro models of rare monogenic diseases of the nervous system.

Due to the lack of alternative sources, induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons and astrocytes are particularly valuable for studies of human disease mechanisms. In the last years, several differentiation protocols to differentiate iPSCs into neurons have been described [28]. Nevertheless, neurons are not the only neural cell type involved in neurological disorders. Research in the last 20 years has emphasized the role of glial cells, especially astrocytes, in the regulation of brain functionality and homeostasis [29]. For that reason, several differentiation protocols to generate astrocytes from iPSCs have been developed [28]. However, these protocols are usually time-consuming and technically challenging and obtained cells are not always well characterized. Transcription factor-based strategies to accelerate differentiation of iPSCs into pure populations of specific cell types have been recently described [30]. These protocols represent a very useful tool considering the need for large-scale production of neurons and astrocytes with high purity for clinical applications and drug screening. Initially, this strategy was shown to drive iPSC differentiation towards excitatory cortical induced neurons (iNs) by lentiviral overexpression of *Ngn2* [31]. With this approach, efficient conversion to a pure population of excitatory neurons with functional synapses was achieved in two weeks. Regarding glial differentiation, functional and mature induced astrocytes (iAs) from iPSCs were obtained in three weeks after lentiviral overexpression of two gliogenic transcription factors, *Nfib* and *Sox9* [32]. These transcription factor-based protocols are valuable tools to rapidly and efficiently generate in vitro models to investigate in depth the role of neurons and astrocytes in neurodegenerative LSDs, as well as to assess and optimize potential therapies through drug and toxicity screening.

The recent development of the CRISPR/Cas9 system [33], an RNA-based genome-editing tool, enables efficient site-specific genome editing to generate isogenic cell lines from iPSCs, either introducing specific mutations in a healthy line or correcting mutations in patient-derived lines. The main advantage of having isogenic lines is to avoid the possibility of detecting non-disease-related phenotypes arising from differences in the genetic background of patients and controls, one of the main drawbacks of iPSC-based studies using several lines. By combining iPSCs with CRISPR/Cas9 genome editing, it is possible to generate models where the only genetic difference between cell lines is the disease-causative mutation. Importantly, after CRISPR/Cas9 editing, the capacity of iPSCs to rapidly proliferate and differentiate remains unaffected due to the high target specificity of this technique [34].

Two previous studies have been performed using Sanfilippo patient-derived iPSCs and differentiation towards the neural lineage [35,36]. In the first study on Sanfilippo B iPSC-derived neurons differentiated for five weeks, authors found bigger intracellular vesicles positive for lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) together with increased and abnormal Golgi complexes. Moreover, gene expression profiles suggested alterations of extracellular matrix constituents as well as cell–matrix interactions during differentiation [35]. However, glial cells were not investigated in this work and their role in disease mechanisms remained unknown. In a second study, Sanfilippo C iPSC-derived neural cultures showed also bigger vesicles positive for LAMP1 and accumulation of GAGs after nine weeks of differentiation [36]. Interestingly, network activity and connectivity were impaired, thus suggesting that lysosomal alterations were leading to functional impairment. Nevertheless, specific astrocyte-phenotypes were again not investigated, keeping unanswered what the exact role is of astrocytes in disease development.

We have previously generated two HGSNAT-mutated iPSC lines [37] through the use of CRISPR/Cas9 and one iPSC line from a Sanfilippo syndrome type C patient's fibroblasts [36]. Here we combined these three iPSC lines with optimized protocols to obtain neurons [31] and astrocytes [32], creating novel and relevant disease models that recapitulate major Sanfilippo syndrome hallmarks. We then assayed an siRNA-based SRT strategy that was successful in treating patient

fibroblasts [25] and showed that this strategy is not effective in neural cells, highlighting the importance of using disease-relevant cells in studies of disease mechanisms and drug screening.

2. Experimental Section

2.1. Human iPSCs

Four previously generated iPSC lines were used: one healthy control (WT) and a patient-derived line (SFC6) [36], and two isogenic mutant lines, HGSNAT1 and HGSNAT2, generated from the WT iPSC line with CRISPR/Cas9 genome editing [37].

All iPSCs were maintained in feeder-free conditions using mTeSR™ Plus medium (STEMCELL Technologies, Grenoble, France) with 0.5% Penicillin Streptomycin (P/S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) on Matrigel (Corning, Corning, NY USA)-treated plates and maintained at 37 °C in humidified air with 5% CO₂, with medium changed every 2–3 days. Cells were passaged with StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (Accutase, Thermo Fisher Scientific) every 3–4 days, when reaching approximately 80% confluency and plating at 2×10^4 cells/cm². To improve survival rate, either 2 µM Thiazovivin (TZV, STEMCELL Technologies) or 10 µM Rock Inhibitor (RI, STEMCELL Technologies) was added to the medium for 24 h after plating.

References for all products can be found in Table S1.

2.2. Lentiviral Production

Lentiviral vectors used were M2-rtTA (rtTA, reverse tetracycline-controlled transactivator, Addgene, Watertown, MA USA), tet-O-Ngn2-puro (Ngn2, Addgene), tetO-Sox9-Puro (Sox9, [32]), and tetO-Nfib-Hygro (Nfib, [32]).

Ngn2, Sox9, Nfib, and rtTA lentiviruses were produced in HEK 293T cells as previously described [32]. Briefly, cells were cotransfected with lentivectors and the packaging plasmids pMD2.G (Addgene), pRSV-Rev (Addgene), and pMDLg/pRRE (Addgene) using 2.5 M CaCl₂. For two T175 flasks, 22 µg of pMD2.G, 15 µg of pRSV-Rev, 30 µg of pMDLg/pRRE, and 75 µg of the desired lentivector plasmids were transfected. The day after, medium was changed and 24 h later, viruses were harvested and pelleted by centrifugation (20,000× *g* for 2 h at 4 °C), supernatant was aspirated, and 100 µL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) added to the virus pellet without resuspending. The day after, viruses were resuspended, aliquoted, and stored at −80 °C.

References for all products in 2.2. are in Table S2.

2.3. Generation of Induced Neurons and Astrocytes from iPSCs

Both neural induction [31] and astrocyte induction [32] were carried out as previously described with minor modifications. Protocol schemes are shown in Figure 1.

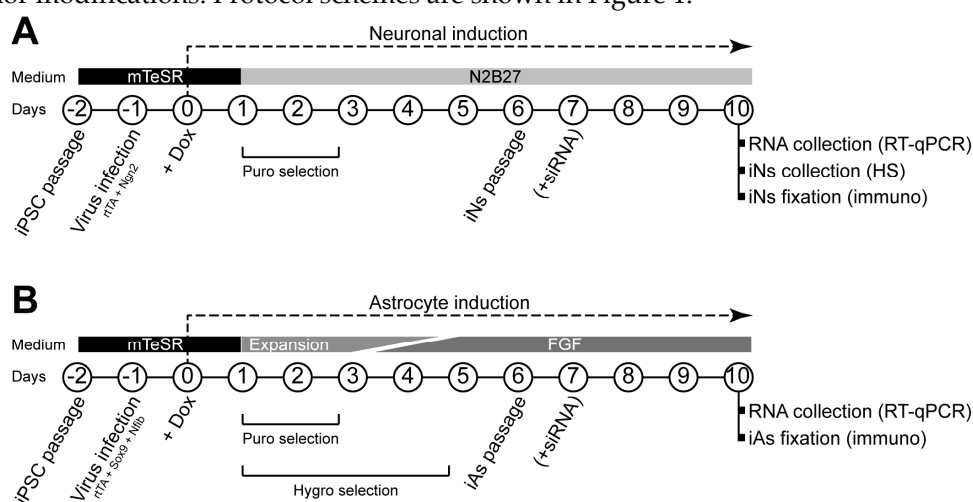


Figure 1. Schemes describing the protocols for induction of neurons (A) and astrocytes (B).

Briefly, on day 2, human iPSCs at approximately 80% confluency were dissociated with Accutase, and 7×10^5 cells were replated in Matrigel-coated six-well plates using mTeSR™ Plus medium with 10 μ M RI. One day later (day 1), medium was replaced by fresh mTeSR™ Plus medium, and 1 μ L of each virus (rtTA and Ngn2 for iNs; rtTA, Nfib, and Sox9 for iAs) was added to each well. On day 0, medium was replaced with fresh mTeSR™ Plus medium containing 2.5 μ g/mL doxycycline (Dox, Thermo Fisher Scientific), which was kept in the medium throughout the experiments.

For neuronal induction, from day +1, medium was changed daily using N2B27 medium (1:1 DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) and Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific), 1% (50 $\times$) B-27™ supplement (Thermo Fisher Scientific), 0.5% (100 $\times$) N-2 supplement (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), and 1% P/S) with 48 h of 1.25 μ g/mL puromycin (Thermo Fisher Scientific) selection. On day +6, cells were dissociated with Accutase over 20 min, and passed through 40 μ m strainers (Corning) to eliminate cell aggregates. Then, 5×10^5 cells were replated in Matrigel-treated six-well plates for real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) heparan sulfate (HS) quantity measurement experiments, and 7×10^4 cells were replated in Matrigel-treated 13 mm coverslips for immunocytochemistry experiments.

For astrocyte induction, on days +1 and +2, cells were cultured in Expansion medium (DMEM/F-12, 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific), 1% (100 $\times$) N-2 supplement, and 1% GlutaMAX). On day +3, 75% of Expansion medium was combined with 25% of FGF medium (Neurobasal, 2% (50 $\times$) B-27™ supplement, 1% non-essential amino acids (NEAA, Thermo Fisher Scientific), 1% GlutaMAX, and 1% FBS, 8 ng/mL fetal growth factor (FGF, Peprotech, London, UK), 5 ng/mL ciliary neurotrophic factor (CNTF, Peprotech), and 10 ng/mL bone morphogenetic protein 4 (BMP4, Peprotech)). On day +4, 50% of Expansion medium was combined with 50% of FGF medium. On day +5, 25% of Expansion medium was combined with 75% of FGF medium. Selection of transduced cells was carried out on days 1–2 adding 1.25 μ g/mL puromycin and on days 1–5 adding hygromycin (200 μ g/mL) (Thermo Fisher Scientific). On day +6, cells were dissociated with Accutase until a single cell suspension was achieved. Then, 5×10^5 cells were replated in Matrigel-treated six-well plates for RT-qPCR experiments using FGF medium alone. For immunocytochemistry, 7×10^4 cells were replated in Matrigel-treated 13 mm coverslips using FGF medium alone.

References for all products in 2.3. are in Table S3.

2.4. siRNA Transfection

Neurons and astrocytes grown in six-well plates were transfected on day +7 using 2 μ L per well of Lipofectamine RNAiMAX transfection agent (Thermo Fisher Scientific). One siRNA Silencer® Select against *EXTL2* gene (siRNA-4899, Assay ID: si4899, Thermo Fisher Scientific) and one negative control siRNA (siRNA-C, Thermo Fisher Scientific) were used at a final concentration of 30 nM and one well was treated with Lipofectamine RNAiMAX alone (No-siRNA) as a control.

References for all products in 2.4. are in Table S4.

2.5. Immunofluorescence Staining

Neurons or astrocytes were fixed on day +10 with 4% paraformaldehyde (PFA, VWR, Llinars del Vallés, Spain) for 15 min, washed with tris-buffered saline (TBS, Thermo Fisher Scientific), blocked and permeabilized with TBS containing 0.1% Triton-X 100 (VWR) and 5% normal donkey serum (Merck KGaA, TBS++) for 2 h at room temperature. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. The day after, cells were washed twice for 5' with TBS, 5' with TBS++ and secondary antibodies and 0.5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific) or 1 μ g/mL Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) were incubated 2 h at room temperature in TBS++. After washing 5' with TBS for three times and once with ddH₂O, coverslips were mounted on slides with Mowiol® 4-88 (Merck KGaA) mounting medium.

Images were acquired using ZEISS confocal microscope, and then all images were mounted using the Fiji-ImageJ software [38]. Analysis of images was performed with summation of 10 z-stacks separated by 0.36 μ m. First, soma area was defined by Tuj1+ staining and, within this area, the

lysosomal associated membrane protein 2 (LAMP2) area was measured establishing a threshold with Li algorithm. To obtain LAMP2/Tuj1 area, both areas obtained were divided for each z-stack summation. Mean intensity data were obtained directly measuring the mean intensity inside the area established by the LAMP2 threshold.

References for all products in 2.5. are in Table S4.

References for antibodies used in 2.5. are in Table S5.

2.6. RT-qPCR

RNA was extracted at day +10 using High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland), and 2 µg of total RNA was used to synthesize cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific) and the RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific), following manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed in LightCycler 480 II (Roche) system with a LightCycler 480 Probes Master (Roche) and TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific). Quantification cycle (Cq) calculation was done using LightCycler 480 Software (release 1.5.0, Roche). To confirm reproducibility of RT-qPCR, the intra-assay precision was determined in three repeats within one LightCycler run. Intra-assay coefficient variation of all assays at our working conditions was below 1% and Cq standard deviation smaller than 0.3. In all experiments, GAPDH expression was stable and used as a normalizer.

References for all products in 2.6. are in Table S4. References for TaqMan assays used in 2.6. are in Table S6.

2.7. HS Quantity Measurement

For HS quantity measurement experiments (UPLC-MS/MS), cells were collected at day +10 using cell scrapers (Labclinics, Barcelona, Spain), centrifuged at 300× g for 5 min, resuspended on 70 µL of ddH₂O, and subjected to a four-cycle freezing (−80 °C)/thawing (4 °C) protocol to lyse the cells. Protein concentration was measured using DC™ Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA USA), based on the Lowry method (reference in Table S4) and HS was quantified using an established protocol based on UPLC-MS/MS [39].

2.8. Data Analysis

Data are presented as the mean ± s.e.m. of three independent experiments. Statistical analyses were performed using an appropriate test in Prism software. For cell-specific markers RT-qPCR, ratio paired t-test was performed. For area and intensity measurements of LAMP2, as well as for UPLC-MS/MS HS measurements, we used ordinary one-way ANOVA corrected by Dunnett post hoc test, comparing WT-iNs with the other groups. In the case of *EXTL2* mRNA expression RT-qPCR after siRNA treatment, an ordinary one-way ANOVA corrected by Tukey post hoc test was used. Significance was set at $p < 0.05$ for all experiments.

3. Results

3.1. Generation of iNs and iAs to Model Sanfilippo C Syndrome

To develop new neuronal and astrocytic models for Sanfilippo C syndrome, we differentiated iPSC lines into induced neurons (iNs) and induced astrocytes (iAs) using lentiviral overexpression of Ngn2 (iNs) or Sox9 and Nfib (iAs) as previously described [31,32]. We used one healthy control iPSC line (WT) and three disease iPSC lines, two generated from the WT line using CRISPR/Cas9 (HGSNAT1 and HGSNAT2) and one patient-derived iPSC line (SFC6). All mutant lines carried mutations in both alleles of the *HGSNAT* gene leading to decreased enzymatic activity [36,37].

To confirm differentiation, we examined expression of cell-type-specific markers using qPCR and immunocytochemistry. At day 10 after induction, pluripotency-related genes NANOG and POU5F1 (Figure 2A and 2B, respectively) were pronouncedly downregulated. On the other hand, neuronal-specific genes TUBB3, SYP, and MAP2 (Figures 2C–E) were highly upregulated in iNs

compared to iPSCs, confirming acquisition of neuronal fate. Similarly, an evident increase in expression of astrocyte-specific genes GFAP, S100B, and ALDH1L1 (Figure 2F–H, respectively) was observed after iPSC differentiation into iAs.

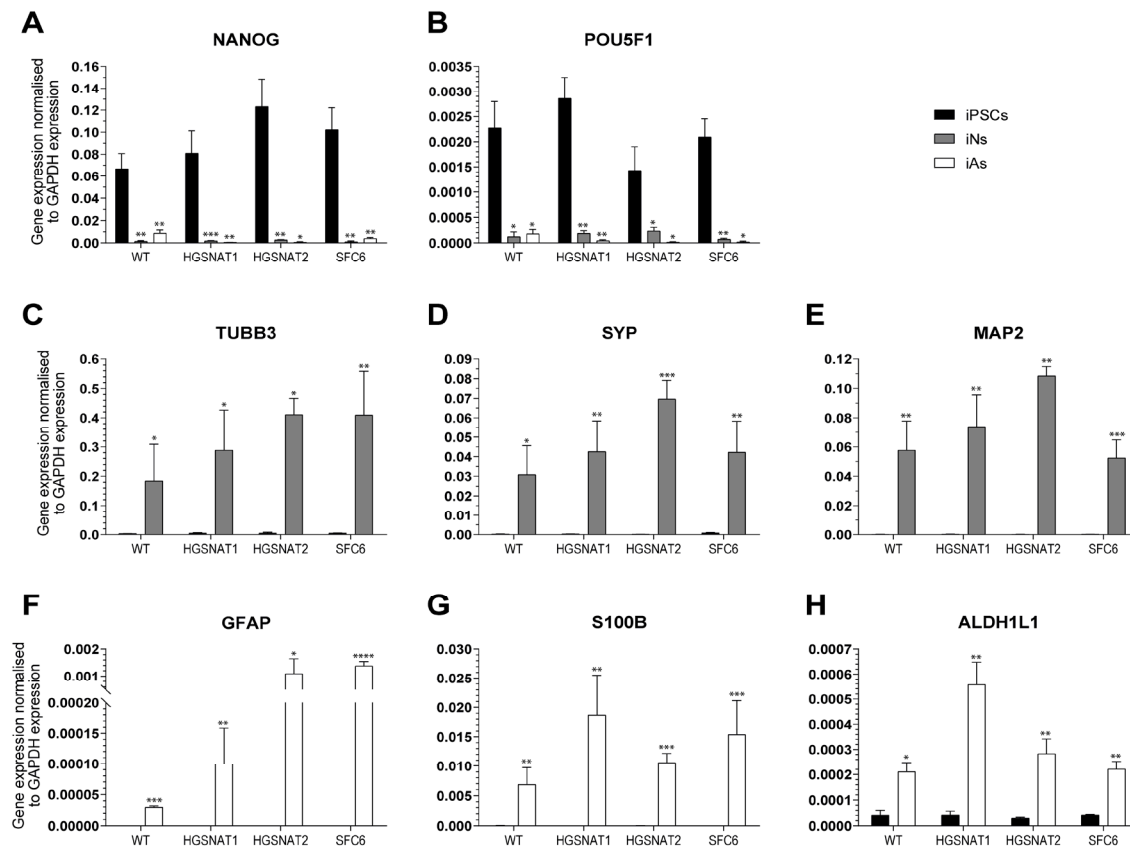


Figure 2. Cell-type-specific marker expression measured by qPCR in iPSCs (black), iNs (grey), and iAs (white) from all lines: WT, HGSNAT1, HGSNAT2, and SFC6. NANOG (A) and POU5F1 (B) are iPSC-associated markers; TUBB3 (C), SYP (D), and MAP2 (E) are neuronal-specific markers; and GFAP (F), S100B (G), and ALDH1L1 (H) are characteristic markers for astrocytes. Gene expression is normalized to GAPDH expression. Data are shown as the mean $\pm$ s.e.m. from three independent experiments with two technical replicates. **** p value < 0.0001 , *** p value < 0.001 , ** p value < 0.01 , * p value < 0.05 , ratio paired t-test comparing iPSC vs. iN or iAs.

To further confirm differentiation towards neurons and astrocytes, we analyzed expression of cell-type-specific markers by immunocytochemistry 10 days after induction. For neurons, Tuj1 and MAP2 were detected in a majority of iNs while for astrocytes, S100B and VIM were found in most iAs. Results were the same for iNs and iAs differentiated from all iPSC lines (Figure 3), indicating similar and high potential to rapidly generate pure populations of neurons and astrocytes with transcription factor-based protocols for all iPSC lines.

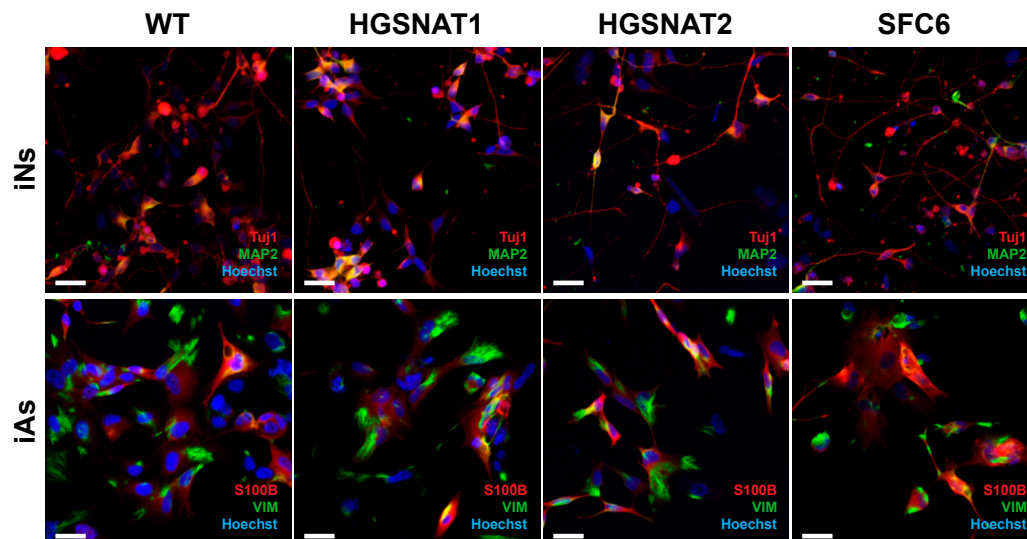


Figure 3. Representative images of differentiated iNs from all iPSC lines (WT, HGSNAT1, HGSNAT2, and SFC6) positive for Tuj1 (red) and MAP2 (green) and iAs from all iPSC lines positive for S100B (red) and VIM (green). Nuclei were detected with Hoechst (blue). Scale bar = 25 μ m.

3.2. iNs and iAs Recapitulate Major Sanfilippo C Phenotypes

Next, we sought to evaluate whether iNs and iAs derived from disease lines recapitulated main Sanfilippo syndrome phenotypes and would represent good cellular models of the disease. For that purpose, we performed two different experiments: LAMP2 immunocytochemical analysis to detect alterations in the lysosomal content of disease cells and HS quantification through UPLC-MS/MS to compare HS amounts between disease and healthy cells.

LAMP2 has been extensively used as a marker for lysosomes. Using immunocytochemistry (Figure 4A), we found an increase of about 5% in the area occupied by LAMP2+ vesicles in the neuronal soma of HGSNAT2-iNs compared to WT-iNs, but not in the other lines (Figure 4B). When LAMP2 intensity was assessed, all disease lines showed a tendency to have increased levels compared to the WT (Figure 4C). Our results suggest that there is a slight increase in the lysosomal content of disease iNs compared to healthy iNs after only 10 days of in vitro differentiation from iPSCs.

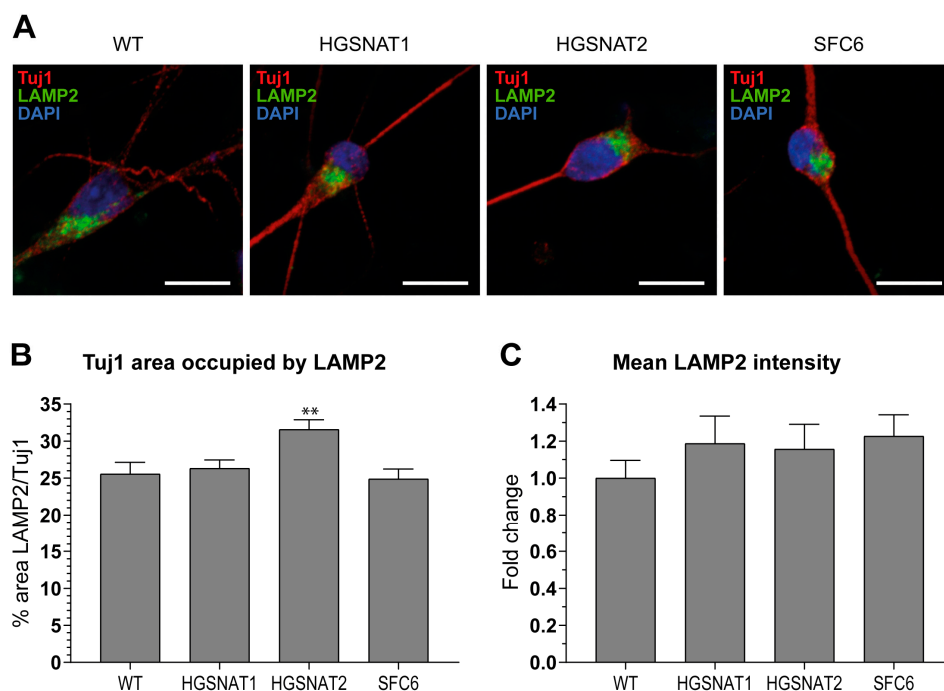


Figure 4. LAMP2 analysis in iNs. (A) Representative images of iNs after 10 days of differentiation positive for LAMP2 (green) and Tuj1 (red). DAPI was used to detect nuclei (blue). Scale bar = 10 μ m. (B) Quantification of the lysosomal content shown as LAMP2+ coverage of the Tuj1+ neuronal soma. (C) Fold change in the mean LAMP2 dot intensity in disease iNs normalized to mean intensity of LAMP2 in WT-iNs. Data are shown as the mean $\pm$ s.e.m. from three independent experiments with five technical replicates. ** p value < 0.01, ordinary one-way ANOVA corrected by Dunnett post hoc test, comparing all groups to WT.

As Sanfilippo syndrome patients accumulate HS and previous studies in fibroblasts confirmed this phenotype [25], we measured the amount of HS in iNs obtained from all iPSC lines with UPLC-MS/MS. We identified a tendency towards increased levels of HS in disease iNs compared to the healthy control, suggesting that iNs displayed one of the major cellular phenotypes associated with Sanfilippo syndrome (Figure 5).

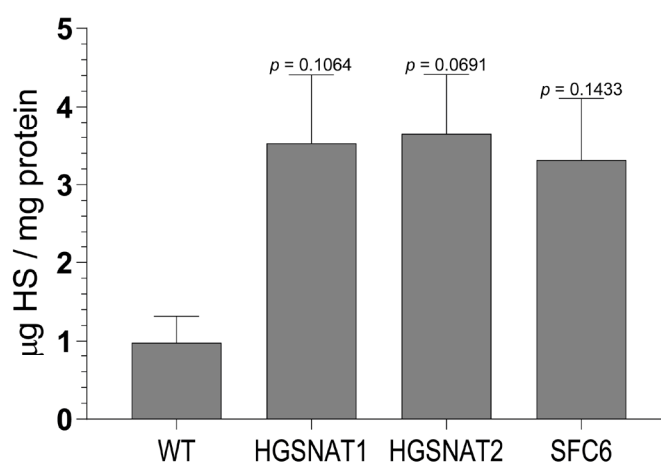


Figure 5. HS quantification by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS) in iNs derived from all iPSC lines: WT, HGSNAT1, HGSNAT2, and SFC6. HS quantity is expressed in μ g of HS in relation to mg of total protein. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. from three independent experiments with two technical replicates. One-way ANOVA corrected by Dunnett post hoc test, comparing all groups with the WT.

3.3. Short-Term siRNA-Based SRT Is Not Efficient in Disease-Relevant Cells

One of the main applications of iPSCs and transcription factor-based protocols to induce differentiation is to test therapeutic approaches in relevant cell types that are difficult to obtain directly from patients. We wanted to evaluate an SRT based on siRNA that we have successfully applied on patients' fibroblasts [25]. We selected an siRNA against the *EXTL2* gene, which codes for a protein involved in the first steps of HS-specific biosynthesis. This siRNA showed promising results in decreasing *EXTL2* expression and reducing GAG synthesis as well as HS storage in patient fibroblasts [25]. To test its therapeutic potential in iNs and iAs, we evaluated how mRNA levels and HS amounts were changed after short treatment with the siRNA.

Both iAs and iNs were treated independently with two siRNAs, one against *EXTL2* (siRNA-4899) and a control siRNA (siRNA-C). We observed a high reduction (around 75%) of *EXTL2* mRNA in both iNs and iAs differentiated from all disease iPSC lines compared with cells treated only with transfection reagent or a control siRNA (Figure 6). These results confirmed that siRNA-4899 was efficiently downregulating *EXTL2* mRNA in iNs and iAs as previously found in fibroblasts [25].

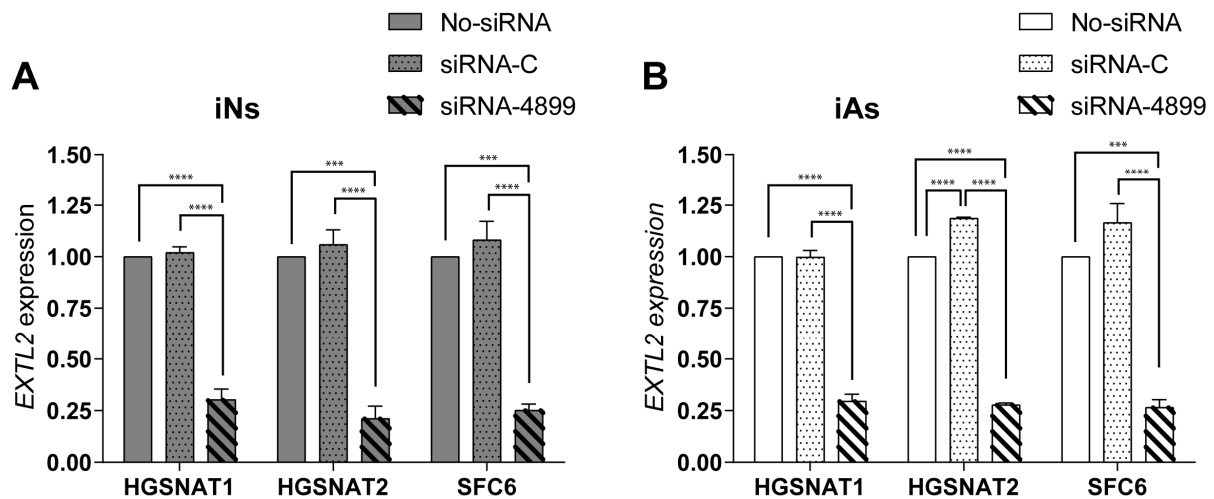


Figure 6. *EXTL2* mRNA expression after siRNA treatment in iNs (A) and iAs (B) derived from three different *HGSNAT*-mutated cell lines: HGSNAT1, HGSNAT2, and SFC6. Expression of *EXTL2* mRNA was normalized to GAPDH and relative to transfection with no-siRNA. Data are shown as mean $\pm$ s.e.m. from three independent experiments with two technical replicates. **** p value < 0.0001, *** p value < 0.001, ordinary one-way ANOVA corrected by Tukey post hoc test, comparing all three groups between each other within each cell line.

We next sought to elucidate whether the decrease in *EXTL2* mRNA levels would lead to reduced amounts of HS in treated iNs. To answer this question, we compared HS levels in iNs derived from the HGSNAT2 cell line treated with the siRNA-C or with the siRNA-4899. Although siRNA treatment reduced *EXTL2* mRNA levels by 75%, we could not detect a decrease in HS amounts compared to cells treated with siRNA-C. These results are in contrast with previous data obtained with patient fibroblasts in which HS levels were significantly decreased three days after treatment [25].

4. Discussion

In this study, we demonstrate that using protocols to produce iNs and iAs from iPSCs is an easy, efficient, and rapid way to generate relevant human cells for disease modeling of LSDs. For years, Sanfilippo syndrome cellular studies aiming to clarify disease mechanisms or to test therapeutic approaches have been performed on nonrelevant cells [25], on brain cells obtained with differentiation following developmental cues [35,36], or in murine models [40,41]. Although animal models can be useful, they do not accurately recapitulate human brain cells, which have a higher degree of morphological and functional complexity. Moreover, human cellular models may provide new, complementary, and useful information that might not be possible to obtain from animal models. Differentiation protocols dependent on sequential treatment with signaling molecules based on developmental cues are time-consuming and usually yield variable cell populations. This hampers reproducibility and comparability between different iPSC lines and performing high-throughput studies may be challenging. To bypass all these issues, we have in this study used novel transcription factor-based protocols to generate new neuronal and astrocytic cellular models for Sanfilippo syndrome type C that will facilitate studies on disease mechanisms and therapeutic approaches.

We have differentiated iNs and iAs from three different previously generated iPSC lines carrying mutations in the *HGSNAT* gene, responsible for Sanfilippo C syndrome. One of these lines was derived from Sanfilippo syndrome type C patient fibroblasts (SFC6) [36] and the other two were obtained by CRISPR/Cas9 gene editing from a healthy control iPSC line [37]. Importantly, the two engineered lines were isogenic to the WT healthy control used in this work, excluding the risk of detecting phenotypes arising from different genetic backgrounds instead of the disease-causative mutation, one of the main drawbacks of iPSC studies using lines from different donors. After 10 days of differentiation, cell identity was confirmed by expression of several cell-type-specific markers both at the mRNA and protein level. Major changes in differentiation efficiency were not detected,

suggesting that Sanfilippo syndrome type C mutations do not hamper neuronal or astrocytic differentiation. This is not surprising considering that iNs and iAs protocols accelerate iPSC differentiation by overexpression of lineage-specific transcription factors, which could veil developmental impairments that might occur in patients. However, we have previously differentiated the SFC6 line together with the WT and another disease line using a protocol based on developmental cues and no significant differences in efficiency were found [36], suggesting that neuronal and astrocytic differentiation from iPSC is not affected by the presence of disease-causative mutations.

Importantly, we found that iNs displayed increased HS levels, one of the hallmarks of the disease at the cellular level, together with a slight enlargement in the lysosomal compartment of disease-iNs compared with WT-iNs based in the somatic area occupied by lysosomes and intensity of LAMP2+ vesicles. In a previous work, iPSC-derived neural cultures showed an increase of about 10% in LAMP2-positive vesicles in the soma of patient-derived lines after nine weeks of differentiation [36]. Here, iNs were differentiated for only 10 days, which could explain the lower degree of lysosomal enlargement. Altogether, our results suggest that an increased number and/or size of lysosomes are found in the neuronal soma of disease iNs, supporting the hypothesis that pathological phenotypes are starting to arise in this cellular model although longer times of differentiation might be needed to detect significant changes. In line with these results, HS also showed a clear tendency to accumulate in all Sanfilippo-derived iNs, recapitulating the main phenotype of the disease. This result suggests that transcription factor-based protocols were able not only to speed up the differentiation process but also to generate cells with earlier storage of HS. Here, disease iNs showed a 3.5-fold increase in HS when compared to a healthy control, while in a previous work, a 2-fold increase in GAGs was found only after nine weeks of differentiation [36], a difference that could be due to various factors. First, here we used a differentiation protocol that generates a pure population of excitatory neurons, while in the previous work iPSC-derived neural stem cells were differentiated towards a pan-neuronal phenotype mixed with astrocytes. Thus, excitatory neurons could accumulate higher amounts of HS or have a faster degree of accumulation. Second, here we measured HS with UPLC-MS/MS, while in the previous work we measured amounts of GAGs. HS is the specific GAG stored in Sanfilippo syndrome, but there are five different types of sulfated GAGs that could not be differentiated with the quantification of total GAGs. This issue could lead to an underestimation of specific HS differences. Nevertheless, our results confirm that iNs recapitulate major Sanfilippo syndrome phenotypes and will be a very valuable model in future studies on LSD mechanisms and drug screening.

It is essential to generate human cellular models with early alterations mimicking those occurring in Sanfilippo patients to have better and faster tools for disease modeling and drug screening studies. In previous works, disease-related alterations were detected at later stages of differentiation and differentiation protocols mimicking developmental cues were used [35,36], obtaining mixed populations of neurons and astrocytes. However, specific phenotypes in astrocytes were not investigated. Here, we show that Sanfilippo iPSC lines can be quickly and efficiently differentiated to pure populations of iNs and iAs, allowing to independently generate each cell type and investigate cell-specific phenotypes and meeting the requirements for scalable and high-throughput studies. This highlights the benefit of using transcription factor-based protocols in studies of disease mechanism and therapeutic approaches for LSDs with neurological affection.

To support this idea, we tested an siRNA-based SRT previously assessed in patient fibroblasts [25] to evaluate its potential in relevant human cells. HS biosynthesis occurs in the Golgi compartment, where a linkage region in a core protein is formed as a starting point for GAG chain elongation. Synthesis of the linkage region is common for other GAGs, however, HS chain formation is specifically carried out by proteins of the EXT (EXT1 and EXT2) and EXTL (EXTL1, EXTL2, and EXTL3) families [42]. Considering that dominant mutations in *EXT1* and *EXT2* genes cause hereditary multiple exostoses [43] and the *EXTL1* gene is expressed at very low levels in brain cells [44], *EXTL2* and *EXTL3* represent the most promising candidates in this pathway for SRT. In Sanfilippo fibroblasts, an siRNA-mediated reduction of *EXTL2* and *EXTL3* mRNAs was shown to decrease

amounts of GAGs and, specifically, HS after three days of treatment. Here, we decided to test the most efficient siRNA (targeting the *EXTL2* gene) in iNs and iAs derived from our three mutated lines. In both cell types, siRNA treatment led to a substantial reduction (up to 75%) of *EXTL2* mRNA levels, consistent with what was previously found in fibroblasts [25]. However, and in contrast to what occurred in fibroblasts, this reduction did not promote a decrease in HS levels of iNs, a difference that could be due to several causes. Fibroblasts are often used as human cellular models in LSDs, but there are significant metabolic differences between fibroblasts and neural cell types. Although fibroblasts accumulate undegraded materials, storage can be underestimated due to dilution by cell division [26], which can mitigate phenotypes that would otherwise be prominent in neuronal cells. Moreover, there are intrinsic differences in each cell type that might lead to changes in the capacity of cells to remove the already synthesized HS after treatment. In addition, some studies suggest that *EXTL2* could act as a suppressor of HS biosynthesis in the liver of a mouse model [45] and liver cells of mice deficient in *EXTL2* produced significantly more HS during regeneration [46]. Future studies should better clarify the role of *EXTL2* in HS synthesis in neurons and astrocytes. At the moment, our results suggest that inhibition of *EXTL2* mRNA in iNs is not sufficient to reduce HS storage or that this inhibition should be maintained longer in order to see an effect on HS amounts in this cell type. Importantly, our results clearly demonstrate the importance of using relevant cell types for drug screening studies in order to test the efficacy of potential treatments in the target human cell.

It remains to be evaluated whether siRNAs against *EXTL3* reduce HS storage in iNs, considering that alternative functions have not been described for *EXTL3*. In addition, it will be interesting to examine LAMP2- and HS-related phenotypes in iAs, due to the important role of astrocytes in neurological disorders [29] and the potential of SRT targeting *EXTL2* and *EXTL3* in iAs. Finally, another important aspect that has to be further investigated is which class of HS is predominantly accumulated and the sulfation pattern of HS chains in each cell type as well as the presence of secondary aggregates of GAGs other than HS both in neurons and astrocytes.

5. Conclusions

In this study, we have generated Sanfilippo C syndrome neurons and astrocytes that recapitulated major hallmarks of the disease using transcription factor-driven protocols that allow fast and efficient differentiation of iPSCs. Combining these two techniques will allow rapidly generating substantial new data to get insights on the basis of this neurodegenerative disease in patient relevant cell types, in contrast to commonly used nonrelevant cells like fibroblasts. Moreover, we provide evidence that these relevant cellular models provide a unique and important tool for drug screening after testing an siRNA-based SRT that proved to be successful on patient fibroblasts and failed in neurons. Our data highlights the importance of using appropriate relevant human cell types in future studies to avoid the limitations of using somatic cells to model neurodegenerative diseases. We strongly anticipate that iNs and iAs will be useful tools to rapidly evaluate therapeutic strategies in relevant human brain cell models of neurological disorders.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Products used for human iPSCs maintenance; Table S2: Products used for lentiviral production; Table S3: Products used for the generation of induced neurons and astrocytes from iPSCs; Table S4: Products used for siRNA transfection, immunocytochemistry, RT-qPCR, ELISA, and protein quantification; Table S5: Antibodies used for immunocytochemistry; Table S6: TaqMan assays used for qPCR.

Author Contributions: Conceptualization, N.B., D.G., L.V., and I.C.; methodology, N.B., M.C., L.C.-V, O.Z., M.S., E.S.-B., M.G.-M., A.R., and I.C.; software, N.B. and I.C.; validation, N.B. and I.C.; formal analysis, N.B.; investigation, N.B., D.G., L.V., and I.C.; resources, A.R., D.G., L.V., H.A., and I.C.; data curation, I.C.; writing—original draft preparation, N.B.; writing—review and editing, D.G., L.V., H.A., and I.C.; visualization, M.C., L.C.-V, O.Z., M.S., E.S.-B., and A.R.; supervision, D.G., L.V., and I.C.; project administration, D.G., L.V., and I.C.; funding acquisition, D.G., L.V., and I.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-75948-R), Catalan Government (2014SGR932), CIBERER (U720), MPS España, Fundación Stop Sanfilippo, Swedish Research Council, Åke Wiberg and Linneá and Josef Carlssons foundations.

Acknowledgments: Thanks to Manel Bosch for his support given in confocal microscope images acquisition and Leal Oburoglu for critical reading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Futerman, A.H.; van Meer, G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 554–565.
2. Neufeld, E.F.; Muenzer, J. The mucopolysaccharidoses. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed.; Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Eds.; McGraw-Hill: New York, USA, **2001**; Volume 3, pp. 3421–3452.
3. Andrade, F.; Aldámiz-Echevarría, L.J.; Llaena, M.; Couce, M.L. Sanfilippo syndrome: Overall review. *Pediatr. Int.* **2015**, *57*, 331–338.
4. Fedele, A.O. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. *Appl. Clin. Genet.* **2015**, *8*, 269–281.
5. Zelei T.; Csetneki, K.; Vokó, Z.; Siffel, C. Epidemiology of Sanfilippo syndrome: results of a systematic literature review. *Orphanet. J. Rare Dis.* **2018**, *13*, 53.
6. Klein, U.; Kresse, H.; von Figura, K. Sanfilippo syndrome type C: Deficiency of acetyl-CoA: α -glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1978**, *75*, 5185–5189.
7. Fan, X.; Zhang, H.; Zhang, S.; Bagshaw, R.D.; Tropak, M.B.; Callahan, J.W.; Mahuran, D.J. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 738–744.
8. Hřebíček, M.; Mrázová, L.; Seyrantepe, V.; Durand, S.; Roslin, N.M.; Nosková, L.; Hartmannová, H.; Ivánek, R.; Cízková, A.; Poupetová, H.; et al. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 807–819.
9. Fan, X.; Tkachyova, I.; Sinha, A.; Rigat, B.; Mahuran, D. Characterization of the biosynthesis, processing and kinetic mechanism of action of the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC. *PLoS One* **2011**, *6*, e24951.
10. Parenti, G.; Andria, G.; Ballabio, A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 471–486.
11. Wijburg, F.A.; Whitley, C.B.; Muenzer, J.; Gasperini, S.; Del Toro, M.; Muschol, N.; Cleary, M.; Sevin, C.; Shapiro, E.; Bhargava, P.; et al. Intratechal heparan-N-sulfatase in patients with Sanfilippo syndrome type A: A phase IIb randomized trial. *Mol. Genet. Metab.* **2019**, *126*, 121–130.
12. Welling, L.; Marchal, J.P.; van Hasselt, P.; van der Ploeg, A.T.; Wijburg, F.A.; Boelens, J.J. Early Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cell Transplantation Does Not Prevent Neurological Deterioration in Mucopolysaccharidosis Type III. *JIMD. Rep.* **2015**, *18*, 63–68.
13. Parenti, G.; Andria, G.; Valenzano, K.J. Pharmacological chaperone therapy: Preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 1138–1148.
14. Feldhammer, M.; Durand, S.; Pshezhetsky, A.V. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PLoS One* **2009**, *4*, e7434.
15. Tardieu, M.; Zerah, M.; Gougeon, M.L.; Ausseil, J.; de Bournonville, S.; Husson, B.; Zafeiriou, D.; Parenti, G.; Bourget, P.; Poirier, B.; et al. Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *Lancet Neurol.* **2017**, *16*, 712–720.
16. Tardieu, M.; Zerah, M.; Husson, B.; de Bournonville, S.; Deiva, K.; Adamsbaum, C.; Vincent, F.; Hocquemiller, M.; Broissand, C.; Furlan, V.; et al. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cdnas in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: Results of a phase I/II trial. *Hum. Gene Ther.* **2014**, *25*, 506–516.
17. Bajaj, L.; Lotfi, P.; Pal, R.; di Ronza, A.; Sharma, J.; Sardiello, M. Lysosome biogenesis in health and disease. *J. Neurochem.* **2019**, *148*, 573–589.

18. Tordo, J.; O'Leary, C.; Antunes, A.S.L.M.; Palomar, N.; Aldrin-Kirk, P.; Basche, M.; Bennett, A.; D'Souza, Z.; Gleitz, H.; Godwin, A.; et al. A novel adeno-associated virus capsid with enhanced neurotropism corrects a lysosomal transmembrane enzyme deficiency. *Brain* **2018**, *141*, 2014–2031.
19. Roberts, A.L.; Rees, M.H.; Klebe, S.; Fletcher, J.M.; Byers, S. Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol. Genet. Metab.* **2007**, *92*, 115–121.
20. Jakóbkiewicz-Banecka, J.; Piotrowska, E.; Narajczyk, M.; Barańska, S.; Wegrzyn, G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 26.
21. Malinowska, M.; Wilkinson, F.L.; Langford-Smith, K.J.; Langford-Smith, A.; Brown, J.R.; Crawford, B.E.; Vanier, M.T.; Gryniewicz, G.; Wynn, R.F.; Wraith, J.E.; et al. Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One* **2010**, *5*, e14192.
22. Delgadillo, V.; O'Callaghan, M.M.; Artuch, R.; Montero, R.; Pineda, M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J. Inher. Metab. Dis.* **2011**, *34*, 1039–1044.
23. Kaidonis, X.; Liaw, W.C.; Roberts, A.D.; Ly, M.; Anson, D.; Byers, S. Gene silencing of EXTL2 and EXTL3 as a substrate deprivation therapy for heparan sulphate storing mucopolysaccharidoses. *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**, *18*, 194–199.
24. Dziedzic, D.; Wegrzyn, G.; Jakóbkiewicz-Banecka, J. Impairment of glycosaminoglycan synthesis in mucopolysaccharidosis type IIIA cells by using siRNA: A potential therapeutic approach for Sanfilippo disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**, *18*, 200–205.
25. Canals, I.; Benetó, N.; Cozar, M.; Vilageliu, L.; Grinberg, D. EXTL2 and EXTL3 inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13654.
26. Zunke, F.; Mazzulli, J.R. Modeling neuronopathic storage diseases with patient-derived culture systems. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *127*, 147–162.
27. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
28. Tao, Y.; Zhang, S.C. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 573–586.
29. Verkhratsky, A.; Nedergaard, M. Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* **2019**, *98*, 239–389.
30. Oh, Y.; Jang, J. Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells by Transcription Factors. *Mol. Cells* **2019**, *42*, 200–209.
31. Zhang, Y.; Pak, C.; Han, Y.; Ahlenius, H.; Zhang, Z.; Chanda, S.; Marro, S.; Patzke, C.; Acuna, C.; Covy, J.; et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neurone* **2013**, *78*, 785–798.
32. Canals, I.; Ginisty, A.; Quist, E.; Timmerman, R.; Fritze, J.; Miskinyte, G.; Monni, E.; Hansen, M.G.; Hidalgo, I.; Bryder, D.; et al. Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 693–696.
33. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821.
34. Li, X.F.; Zhou, Y.W.; Cai, P.F.; Fu, W.C.; Wang, J.H.; Chen, J.Y.; Yang, Q.N. CRISPR/Cas9 facilitates genomic editing for large-scale functional studies in pluripotent stem cell cultures. *Hum. Genet.* **2019**, *138*, 1217–1225.
35. Lemonnier, T.; Blanchard, S.; Toli, D.; Roy, E.; Bigou, S.; Froissart, R.; Rouvet, I.; Vitry, S.; Heard, J.M.; Bohl, D. Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 3653–3666.
36. Canals, I.; Soriano, J.; Orlandi, J.G.; Torrent, R.; Richaud-Patin, Y.; Jiménez-Delgado, S.; Merlin, S.; Follenzi, A.; Consiglio, A.; Vilageliu, L.; et al. Activity and High-Order Effective Connectivity Alterations in Sanfilippo C Patient-Specific Neuronal Networks. *Stem Cell Reports* **2015**, *5*, 546–557.
37. Benetó, N.; Cozar, M.; García-Morant, M.; Creus-Bachiller, E.; Vilageliu, L.; Grinberg, D.; Canals, I. Generation of two compound heterozygous HGSNAT-mutated lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo C syndrome. *Stem Cell Res.* **2019**, *41*, 101616.
38. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.

39. Oguma, T.; Tomatsu, S.; Montano, A.M.; Okazaki, O. Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2007**, *368*, 79–86.
40. Martins, C.; Hůlková, H.; Dridi, L.; Dormoy-Raclet, V.; Grigoryeva, L.; Choi, Y.; Langford-Smith, A.; Wilkinson, F.L.; Ohmi, K.; DiCristo, G.; et al. Neuroinflammation, mitochondrial defects and neurodegeneration in mucopolysaccharidosis III type C mouse model. *Brain* **2015**, *138*, 336–355.
41. Marcó, S.; Pujol, A.; Roca, C.; Motas, S.; Ribera, A.; Garcia, M.; Molas, M.; Villacampa, P.; Melia, C.S.; Sánchez, V.; et al. Progressive neurologic and somatic disease in a novel mouse model of human mucopolysaccharidosis type IIIC. *Dis. Model Mech.* **2016**, *9*, 999–1013.
42. Kreuger, J.; Kjellén, L. Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J. Histochem. Cytochem.* **2012**, *60*, 898–907.
43. Wuyts, W.; Van Hul, W.; De Boulle, K.; Hendrickx, J.; Bakker, E.; Vanhoenacker, F.; Mollica, F.; Lüdecke, H.J.; Sayli, B.S.; Pazzaglia, U.E.; et al. Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *62*, 346–354.
44. Zhang, Y.; Sloan, S.A.; Clarke, L.E.; Caneda, C.; Plaza, C.A.; Blumenthal, P.D.; Vogel, H.; Steinberg, G.K.; Edwards, M.S.; Li, G.; et al. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* **2016**, *89*, 37–53.
45. Nadanaka, S.; Zhou, S.; Kagiya, S.; Shoji, N.; Sugahara, K.; Sugihara, K.; Asano, M.; Kitagawa, H. EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9321–9333.
46. Nadanaka, S.; Kagiya, S.; Kitagawa, H. Roles of EXTL2, a member of the EXT family of tumour suppressors, in liver injury and regeneration processes. *Biochem. J.* **2013**, *454*, 133–145.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary

Table S1. Products used for human iPSCs maintenance.

Product	Reference	Company	Application
mTeSR™ Plus	#05825	STEMCELL Technologies	iPSC medium
Penicillin Streptomycin (P/S)	#15140122	Thermo Fisher Scientific	Cell medium
Matrigel	#354234	Corning	Matrix
StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (Accutase)	#A1110501	Thermo Fisher Scientific	Cell passage
Thiazovivin (TZV)	#72252	STEMCELL Technologies	iPSC survival
ROCK inhibitor (RI)	#Y-27632	STEMCELL Technologies	iPSC survival

Table S2. Products used for lentiviral production.

Product	Reference	Company	Application
M2-rtTA (rtTA)	#20342	Addgene	Viral production
pTet-O-Ngn2-puro (Ngn2)	#52047	Addgene	Viral production
pMD2.G	#12259	Addgene	Viral production
pRSV-Rev	#12253	Addgene	Viral production
pMDLg/pRRE	#12251	Addgene	Viral production
tetO-Sox9-Puro (Sox9)		Henrik Ahlenius group	Viral production
tetO-Nfib-Hygro (Nfib)		Henrik Ahlenius group	Viral production
DMEM	#D5796	Sigma	Virus resuspension

Table S3. Products used for the generation of induced neurons and astrocytes from iPSCs.

Product	Reference	Company	Application
Doxycycline (Dox)	#10592-13-9	Thermo Fisher Scientific	tetO induction
High Pure RNA Isolation Kit	#11828665001	Roche	RNA extraction
Cell scrapers	#179693	LabClinics	Neural passage
PFA 4%	#30525-89-4	VWR	Cell fixation
DMEM/F12	#11330057	Thermo Fisher Scientific	Neural and astrocyte medium
Neurobasal	#21103049	Thermo Fisher Scientific	Neural and astrocyte medium
B-27 supplement	#17504044	Thermo Fisher Scientific	Neural and astrocyte medium
N2 supplement	#17502048	Thermo Fisher Scientific	Neural and astrocyte medium
GlutaMAX	#35050061	Thermo Fisher Scientific	Neural and astrocyte medium
Puromycine	#A1113803	Thermo Fisher Scientific	Cell selection
Sterile filters of 40 µm porus	#352340	Corning	Neural passage
FBS	#16000044	Thermo Fisher Scientific	Astrocyte medium
NEAA	#11140035	Thermo Fisher Scientific	Astrocyte medium
bFGF	#100-18B	Peptotech	Astrocyte medium
CNTF	#450-13	Peptotech	Astrocyte medium
BMP4	#120-05ET	Peptotech	Astrocyte medium

Table S4. Products used for siRNA transfection, immunocytochemistry, RT-qPCR, ELISA and protein quantification.

Product	Reference	Company	Application
Lipofectamine RNAiMAX	#13778075	Thermo Fisher Scientific	siRNA transfection
siRNA Silencer® Select (siRNA)	#4392420	Thermo Fisher Scientific	siRNA transfection
siRNA <i>EXTL2</i> gene	AssayID: si4899		
Negative Control siRNA	#4459405	Thermo Fisher Scientific	siRNA transfection
Triton-X 100	#28817.295	VWR	Immunocytochemistry
Normal Donkey Serum	#S30-100M	Merck Millipore	Immunocytochemistry
DAPI	#D1306	Thermo Fisher Scientific	Immunocytochemistry
Hoechst 33342	#H3570	Thermo Fisher Scientific	Immunocytochemistry
MOWIOL	#475904	Merck Millipore	Immunocytochemistry
High Capacity cDNA Reverse Transcription kit	#4368814	Applied Biosystems	RT-qPCR
rNase Inhibitor	#N8080119	Applied Biosystems	RT-qPCR
LightCycler 480 Probes Master	#04887301001	Roche	RT-qPCR
DC™ Protein Assay	#5000111	Bio-Rad	Protein quantification

Table S5. Antibodies used for immunocytochemistry.

Product	Reference	Dilution	Company
rabbit anti-TUJ1 primary antibody	#MMS-435P	1:500	Covance
Mouse anti-LAMP2 primary antibody	#H4B4-c	1:100	Hybridoma Bank
chicken anti-MAP2 primary antibody	#ab5392	1:5000	Abcam
mouse anti-VIM primary antibody	# M0725	1:250	Dako
rabbit anti-S100B primary antibody	#287003	1:400	Synaptic systems
donkey anti-mouse Cy2 secondary antibody	#715-225-150	1:200	Jackson ImmunoResearch
donkey anti-rabbit Cy3 secondary antibody	#711-165-152	1:200	Jackson ImmunoResearch
donkey anti-chicken AF488 secondary antibody	#703-545-155	1:250	Jackson ImmunoResearch
donkey anti-mouse AF488 secondary antibody	#A-21202	1:250	ThermoFisher Scientific
donkey anti-rabbit AF568 secondary antibody	#A-10042	1:250	ThermoFisher Scientific

Table S6. TaqMan assays used for qPCR.

Product	Reference	Company
TaqMan Gene Expression Assays (TaqMan Assay)	#4331182	Thermo Fisher Scientific
TaqMan Assay GAPDH	Assay ID: Hs99999905_m1	
TaqMan Assay NANOG	Assay ID: Hs02387400_g1	
TaqMan Assay POU5F1	Assay ID: Hs01654807_s1	
TaqMan Assay TUBB3	Assay ID: Hs00801390_s1	
TaqMan Assay SYP	Assay ID: Hs00300531_m1	
TaqMan Assay MAP2	Assay ID: Hs00258900_m1	
TaqMan Assay GFAP	Assay ID: Hs00909233_m1	
TaqMan Assay S100B	Assay ID: Hs00902901_m1	
TaqMan Assay ALDH1L1	Assay ID: Hs00201836_m1	
TaqMan Assay EXTL2	Assay ID: Hs00242124_m1	



Artículo 4

Generation of two *NAGLU*-mutated homozygous cell lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo C syndrome

Noelia Benetó, Mónica Cozar, Laura Gort, Laura Pacheco,
Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg, Isaac Canals

Resumen

Las mutaciones en el gen *NAGLU* causan el síndrome de Sanfilippo B (mucopolisacaridosis IIIB), un raro trastorno de almacenamiento lisosómico cuyo síntoma principal es una neurodegeneración grave y progresiva para la que todavía no hay tratamiento disponible. Aquí, generamos dos líneas celulares homocigotas mutadas en *NAGLU* usando la edición con CRISPR/Cas9 en una línea de células madre pluripotentes inducidas derivadas de humanos sanos (hiPSC). Estas nuevas líneas celulares expresan marcadores específicos de pluripotencia y mantienen su capacidad de diferenciarse en las tres capas embrionarias *in vitro* mientras exhiben un cariotipo normal. Estas líneas mutadas en combinación con la línea de control isogénico serán útiles para modelar el síndrome de Sanfilippo B *in vitro*.



Lab Resource: Multiple Cell Lines

Generation of two *NAGLU*-mutated homozygous cell lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo B syndrome

Noelia Benetó^a, Monica Cozar^a, Laura Gort^b, Laura Pacheco^b, Lluïsa Vilageliu^a, Daniel Grinberg^{a,*}, Isaac Canals^{c,*}

^a Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Fac. Biology, University of Barcelona, CIBERER, IBUB, IRSJD, Spain

^b Secció d'Errors Congènits del Metabolisme -IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, Barcelona, Spain

^c Stem Cells, Aging and Neurodegeneration Group, Lund Stem Cell Center, University Hospital, Lund, Sweden



Mutations in the *NAGLU* gene cause Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis IIIB), a rare lysosomal storage disorder whose main symptom is a severe and progressive neurodegeneration for which no treatment is still available. Here, we generated two homozygous *NAGLU*-mutated cell lines using CRISPR/Cas9 editing in a healthy human induced pluripotent stem cell (hiPSC) line. These novel cell lines express pluripotency specific markers and maintain their capability to differentiate into all three germ layers *in vitro* while exhibit a normal karyotype. These mutated lines in combination with the isogenic control line will be useful to model *in vitro* Sanfilippo B syndrome.

Resource Table

Unique stem cell lines identifier	UBi001-A-3 and UBi001-A-4
Alternative names of stem cell lines	NAGLU3 (UBi001-A-3) and NAGLU4 (UBi001-A-4)
Institution	University of Barcelona (Barcelona, Spain) and Lund Stem Cell Center (Lund, Sweden)
Contact information of distributor	Isaac Canals - isaac.canals@med.lu.se , Daniel Grinberg - dgrinberg@ub.edu
Type of cell lines	Induced pluripotent stem cell line
Origin	Human
Cell Source	Healthy human induced pluripotent stem cell line. Male, 46XY (UBi001-A)
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Retrovirus (the original hiPSC line) (Canals et al., 2015)
Multiline rationale	Isogenic clones
Gene modification	YES
Type of modification	CRISPR/Cas9-mediated indels
Associated disease	Sanfilippo B syndrome
Gene/locus	<i>NAGLU</i> /17q21.2
Method of modification	CRISPR/Cas9
Name of transgene or resistance	N/A
Inducible/constitutive system	N/A

Date archived/stock date 31st July 2019

Cell line repository/bank UBi001-A: <https://hpscreg.eu/cell-line/UBi001-A>, UBi001-A-3: <https://hpscreg.eu/cell-line/UBi001-A-3>, UBi001-A-4: <https://hpscreg.eu/cell-line/UBi001-A-4>

Ethical approval Institutional Review Board (IRB00003099) of the Bioethical Commission of the University of Barcelona (October 20, 2016)

1. Resource utility

Sanfilippo B syndrome is caused by mutations in the N-acetyl-alpha-glucosaminidase (*NAGLU*) gene. The *NAGLU*-mutated hiPSCs generated here, UBi001-A-3 and UBi001-A-4 together with the isogenic control cell line UBi001-A, can be useful for disease modeling as well as to identify potential therapeutic approaches for Sanfilippo B syndrome.

2. Resource details

NAGLU is a gene coding for a protein involved in the degradation of heparan sulfate (HS), a glycosaminoglycan present in the extracellular matrix. Mutations in *NAGLU* lead to lysosomal accumulation of undegraded HS molecules, resulting in dysfunction of the endolysosomal system and causing Sanfilippo B syndrome. Patients present early-onset progressive and severe neurodegeneration for which there is no treatment available yet.

We targeted exon 5 of the *NAGLU* gene in a previously reported healthy hiPSC line (UBi001-A) (Canals et al., 2015) to generate mutated hiPSC lines using a CRISPR/Cas9-mediated editing system (Fig. 1A). A sgRNA targeting *NAGLU* exon 5 together with the ribonucleoprotein Cas9 were used to disrupt the gene by non-homologous end joining (NHEJ). After 48–72 h of transfecting UBi001-A cell line with Cas9-sgRNA complex, sorted single cells were plated into laminin-coated 96-well plates for single cell culture and expansion. To analyze colony genotypes, genomic DNA was isolated and the regions flanking the

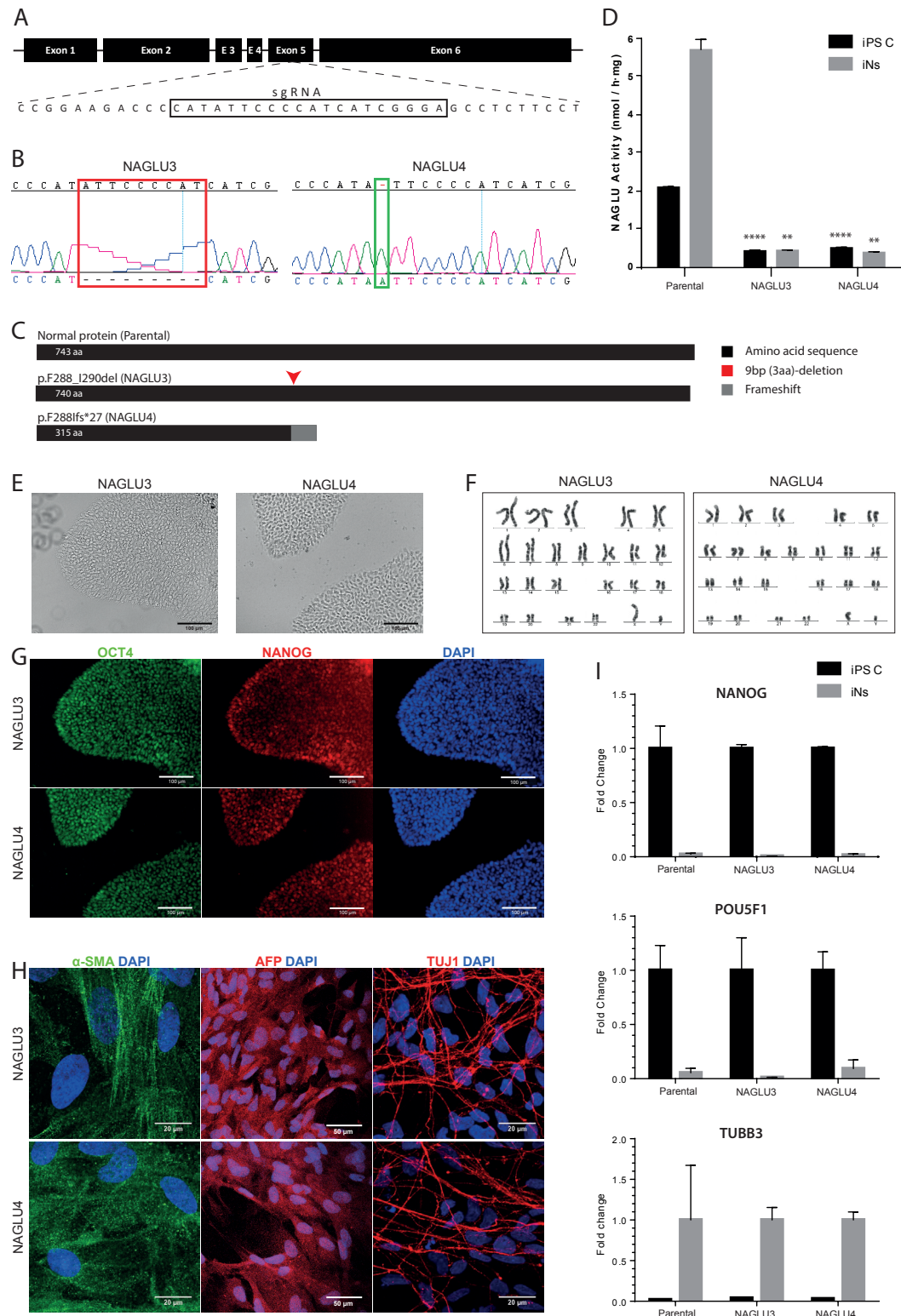
* Corresponding authors.

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101668>

Received 13 November 2019; Accepted 22 November 2019

Available online 29 November 2019

1873-5061/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



(caption on next page)

targeted exon 5 were amplified by PCR, followed by Sanger sequencing, which allowed us to find two homozygous mutated hiPSC clones (Fig. 1B) that were further characterised.

The UBi001-A-3 presented a homozygous 9-bp deletion, which results in the loss of 3 amino acids (p.F288_I290del), from the 743-aminoacid NAGLU protein. UBi001-A-4 had a 1-bp insertion in

Fig. 1. Characterization of *NAGLU*-mutated hiPSC lines UBi001-A-3 (NAGLU3) and UBi001-A-4 (NAGLU4). (A) Illustration showing CRISPR/Cas9 strategy for the *NAGLU* gene, with the sgRNA targeting exon 5. (B) Sanger-sequencing and alignment of both mutated cell lines, showing deletions (in red) and insertions (in green). (C) Scheme of the different resultant proteins, illustrating amino acids in frame (black), amino acid deletions (red) and those after the frameshift (gray). (D) *NAGLU* activity levels in the different hiPSCs and iNs lines, expressed in nmol/h • mg protein (**** *P* value < 0.0001, ** *P* value < 0.01, unpaired *t*-test with Welch's correction for 3 independent experiments with 2 technical replicates). (E) Representative bright-field images showing typical stem cell morphology. Scale bar = 100 µm. (F) Results of the karyotype analysis for both cell lines. (G) Representative images of the immunofluorescence staining for pluripotency markers OCT4 (green) and NANOG (red), and DAPI (blue) for nuclei. Scale bar = 100 µm. (H) *In vitro* differentiation assay to the three germ layers: α-SMA (for mesoderm, green, scale bar = 20 µm), AFP (for endoderm, red, scale bar = 50 µm) and TUJ1 (for ectoderm, red, scale bar = 20 µm). (I) Real-time quantitative PCR analysis showing expression of pluripotent genes *POU5F1* (*OCT4*) and *NANOG*, and neural marker *TUBB3*, normalized to *GAPDH* expression both in hiPSC lines (iPSCs) and induced neurons (iNs). Results are represented as the fold change in gene expression of iNs compared to hiPSC. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Summary of lines.

iPSC line names	Abbreviation in figures	Gender	Age	Ethnicity	Genotype of locus	Disease
UBi001-A-3	NAGLU3	Male	N/A	Caucasian	<i>NAGLU</i> p.(Phe288_Ile290del)	Sanfilippo B syndrome
UBi001-A-4	NAGLU4	Male	N/A	Caucasian	<i>NAGLU</i> p.(F288Ile*27)	Sanfilippo B syndrome

Table 2
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology Phenotype	Photography Qualitative analysis (Immunocytochemistry) Quantitative analysis (RT-qPCR)	Normal Expression of pluripotency markers: OCT4 and NANOG Relative expression of pluripotency markers: positive for OCT4 and NANOG	Fig. 1 Panel E Fig. 1 Panel G Fig. 1 Panel I
Genotype Identity	Karyotype (G-banding) and resolution Microsatellite PCR (mPCR) OR STR analysis	46 XY, Resolution 550–650 Not performed 16 loci tested, 100% matched	Fig. 1 Panel F Available with the authors
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing Off-target analysis	Compound heterozygous mutation in both cases Top 5 predicted off-target analysed and all sequence were correct	Fig. 1 Panel B Supplementary Figure 1 Panel C
Microbiology and virology	Mycoplasma	Negative	Supplementary Figure 1 Panel B
Differentiation potential	Embryoid body formation and differentiation	Endoderm: a-feto protein (AFP), mesoderm: muscle actin (α-SMA), and ectoderm: P-tubulin (TUJ1).	Fig. 1 Panel H
Donor screening (OPTIONAL) Genotype additional info (OPTIONAL)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C Blood group genotyping HLA tissue typing	Not performed Not performed Not performed	

homozygosity, causing a frameshift that changed the open reading frame (p.F288Ile*27) and lead to a shorter protein product of only 315 aa ([Fig. 1B](#) and [C](#), and [Table 1](#)). Both mutations caused a clear reduction in *NAGLU* enzyme activity when compared to the parental cell line levels, in hiPSCs and induced neurons (iNs) derived from the same hiPSC lines ([Fig. 1D](#)). Interestingly hiPSCs lysosomal enzymes have low activity levels, as we have previously reported for HGSNAT ([Canals et al., 2015](#); [Benetó et al., 2019](#)).

Both cell lines presented typical stem cell-like morphology ([Fig. 1E](#)) normal karyotype ([Fig. 1F](#)), and were mycoplasma free ([Fig. S1B](#)). Immunocytochemistry assays demonstrated the expression of pluripotency markers OCT4 (aka *POU5F1*) and NANOG in our mutant hiPSC lines ([Fig. 1G](#)), as well as their potential to differentiate into the three germ layers ([Fig. 1H](#)). We also confirmed in a RT-qPCR that both mutated hiPSC lines expressed high levels of pluripotency markers *NANOG* and *OCT4* and low levels of the neuronal marker *TUJ1* (aka *TUBB3*) when compared to induced neurons (iNs) ([Fig. 1I](#)). Short tandem repeat (STR) analysis confirmed that both cell lines, UBi001-A-3 and UBi001-A-4, had their origin from the hiPSC parental cell line (UBi001-A) (loci listed on [Fig. S1A](#)). Finally, the top-five predicted off-target sites of the sgRNA used were sequenced to confirm that no undesired editing was present in these newly established cell lines ([Fig.](#)

[S1C](#)).

3. Materials and methods

3.1. Cell culture

hiPSC were cultured as in ([Benetó et al., 2019](#)).

3.2. CRISPR/Cas9-mediated mutation

5 × 10⁴ healthy hiPSC per well were plated in Biolaminin521-coated 24-well plates with 10 µM Y-27632 (#72302, STEMCELL Technologies) in StemFlex medium with P/S for 24 h. The day after, cells were transfected with a complex formed by the TrueCut Cas9 Protein v2 (#A36497, Invitrogen) and a pre-designed TrueGuide sgRNA Modified (AssayID: CRISPR1108362_SGM, #A35511, Invitrogen) using Lipofectamine Stem Transfection Reagent (#STEM00001, Invitrogen). 48–72 h after transfection, cells were individually replated after cell sorting onto Biolamina521-coated 96-well plates in the presence of 10 µM Y-27632. Cells were allowed to expand before being analysed by PCR and Sanger sequencing ([Table 3](#)).

Table 3
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry		Dilution	Company Cat # and RRID
	Antibody		
Pluripotency Markers	Mouse anti-OCT4	1:100	Santa Cruz Biotechnology #sc- 5279, RRID: AB_628051
	Rabbit anti-NANOG	1:100	Abcam #ab21624, RRID: AB_446437
Differentiation Markers	Rabbit anti-AFP	1:100	DakoCytomation (now part of Agilent) #A0008, RRID: AB_2650473
	Mouse anti-SMA	1:100	Sigma-Aldrich #A5228, RRID: AB_262054
Secondary antibodies	Rabbit anti-TUJ1	1:500	Covance #MRB-435P, RRID: AB_663339
	Donkey anti-mouse Cy2	1:200	Jackson ImmunoResearch #715225-150, RRID: AB_2340826
	Donkey anti-rabbit Cy3	1:200	Jackson ImmunoResearch #711165-152, RRID: AB_2307443

Primers	Target	Forward/Reverse primer (5'–3')
Targeted mutation	<i>NAGLU</i> Exon 5	GGCAAGAGAAACCAGGAGC / GTGTGTTATGGCGAGGCATT
Potential off-target	POT1: TTCAGATAAAGGGGAATATG	CCGATTTTACAACCTATTGCC / CAAAT GTTGTCTGCT CTTAGT C
	POT2: TATATTCCCATCATCTAGA	GACAAGAGGTAGGTAGCAAG / GAGAATGTGGGAGAAAGGAG
	POT3: CAT ATT CT CCATT CTT GGGA	TGCTGTCTCACTCTGATGGT / GGCTCAGAGTAGGTGTGT
	POT4: CAT ATT CCCCAT CACT GTGG	GGGT AAAT GAGGTGTCTATCGC / ATCTCAGCACTTTGGAAGGC
	POT5: CAT ATT CT CCAT CGTCTGGG	TGAGACTCTACTTGAAGCCA / IIIITGCTGCTGTCCCATG

Probes for RT-qPCR	Target	Assay ID (#4331182, TaqMan)
Pluripotency markers	<i>NANOG</i>	Hs02387400_g1
	<i>OCT4</i>	Hs01654807_s1
Neural marker	<i>TUJ1</i>	Hs00801390_s1
House Keeping	<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1

3.3. Karyotyping, STR analysis and mycoplasma detection

For the karyotype analysis, hiPSC were prepared using 2 ng/ml colcemid (#15212-046, Invitrogen) during 45 min and harvested with StemPro Accutase, then AMBAR (Anàlisi Mèdiques Barcelona) analysed 20 metaphases of each cell line. For STR analysis, AMBAR used gDNA (DNeasy Blood & Tissue Kit #69504, Qiagen) to compare 16 different loci (listed on Fig. S1B) between each mutated cell line and the parental hiPSC. For mycoplasma analysis, Mycoplasma Detection Kit (#4542, Biotools) was used following the manufacturer's instructions.

3.4. *NAGLU* enzyme activity

Enzyme activity was measured as described in Marsh and Fensom (1985).

3.5. Embryonic body (EB) formation and in vitro differentiation

EBs formation differentiation was performed as in Canals et al. (2015) with minor modifications. hiPSC were maintained in StemFlex medium with P/S, and thiazovivin was added from distribution of hiPSC in 96-well plates until EBs were put in suspension.

3.6. Immunofluorescence staining

Cells were fixed in 4% PFA for 15 min, blocked and permeabilised with TBS containing 0.1% Triton-X 100 (#28817.295, VWR) and 5% normal donkey serum (#S30-100 M, Merck Millipore) (TBS + +) for 2 h at room temperature. Primary antibodies (Table 3) were incubated overnight at 4 °C. Secondary antibodies (Table 3) were incubated 2 h at room temperature. Nuclei were stained with 0.5 µg/ml DAPI (#D1306, Invitrogen). Both antibodies and DAPI were diluted in TBS + +. Slides were mounted with MOWIOL (#475904, Millipore). hiPSC images were acquired with ZOE Fluorescence Cell Imager (Bio Rad), images from EBs differentiated into ectoderm (TUJ1) and mesoderm (α-SMA) were acquired using Zeiss confocal microscope LSM 880, and images from EBs differentiated into endoderm (AFP) were acquired using Leica confocal TCS-SP2 microscope. All images were analysed with the Fiji

software (Schindelin et al., 2012).

3.7. Direct neural differentiation and RT-qPCR analysis

Ngn2-induced neurons (iNs) were generated as described in Zhang et al. (2013). Seven days after induction, RNA from iNs was extracted using High Pure RNA Isolation Kit (#11828665001, Roche) and 2 µg of total RNA were used to synthesize cDNA, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (#4368814, Applied Biosystems) and the RNase Inhibitor (#N8080119, Applied Biosystems) following manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed in a LightCycler 480 II (Roche) system with the LightCycler 480 Probes Master (#04887301001, Roche). *GAPDH* was used as normaliser. TaqMan probes are listed in Table 3.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.scr.2019.101668.

References

- Benetó, N., et al., 2019. Generation of two compound heterozygous HGSNAT-mutated lines from healthy induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9 to model Sanfilippo C syndrome. *Stem Cell Res.* 41, 101616.
- Canals, I., et al., 2015. Activity and high-order effective connectivity alterations in Sanfilippo C patient-specific neuronal networks. *Stem Cell Rep.* 5 (4), 546–557.
- Marsh, J., Fensom, A.H., 1985. 4-methylumbelliferyl α-N-acetylglucosaminidase activity for diagnosis of Sanfilippo B disease. *Clin. Genet.* 27 (3), 258–262.
- Schindelin, J., et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Meth.* 9 (7), 676–682.
- Zhang, Y., et al., 2013. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* 78 (5), 785–798.

Supplementary material. Figure S1.

A

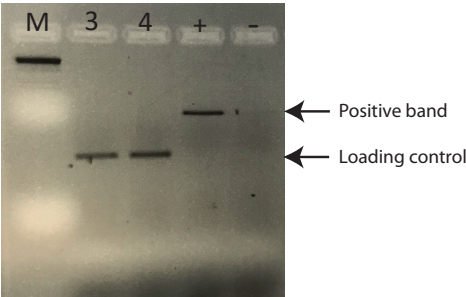
Loci tested in STR analysis

Genetic markers	Chromosomal location
D8S1179	8
D21S11	21q11.2-q21
D7S820	7q11.21-22
CSF1PO	5q33.3-34
D3S1358	3p
TH01	11p15.5
D13S317	13q22-31
D16S539	16q24-qter
D2S1338	2q35-37.1
D19S433	19q12-13.1
VWA	12p12-pter
TPOX	2p23-2per
D18S51	18q21.3
D5S818	5q21-31
FGA	4q28
AMELOGENIN*	X: p22.1-22.3 Y: p11.2

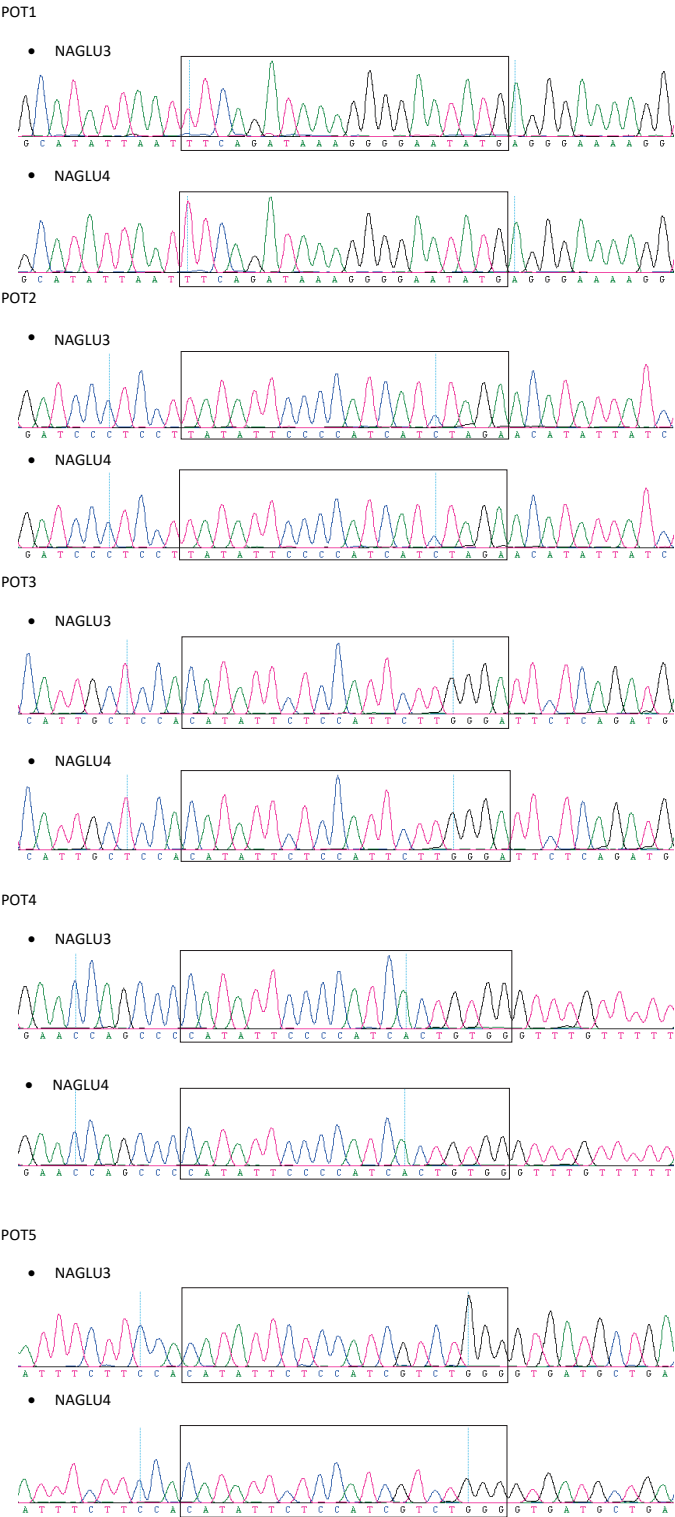
*Amelogenin: Result related with gender: XX (female); XY (male)

B

Mycoplasma detection



C





DISCUSIÓN

Hasta el momento no existe ningún tratamiento efectivo para el síndrome de Sanfilippo al tratarse de una enfermedad crónica, de aparición temprana y multiorgánica, con afectación principalmente en el sistema nervioso central. Aunque existen distintas estrategias terapéuticas y en los últimos años ha habido un gran avance en este aspecto, la afectación neurológica presente en estos pacientes sigue siendo difícil de abordar (Gaffke et al, 2018). Para conseguir desarrollar un tratamiento para esta enfermedad, se requiere de una estrategia terapéutica que permita una completa eliminación de los intermediarios del heparán sulfato (HS) almacenados en el lisosoma (Figura 29).

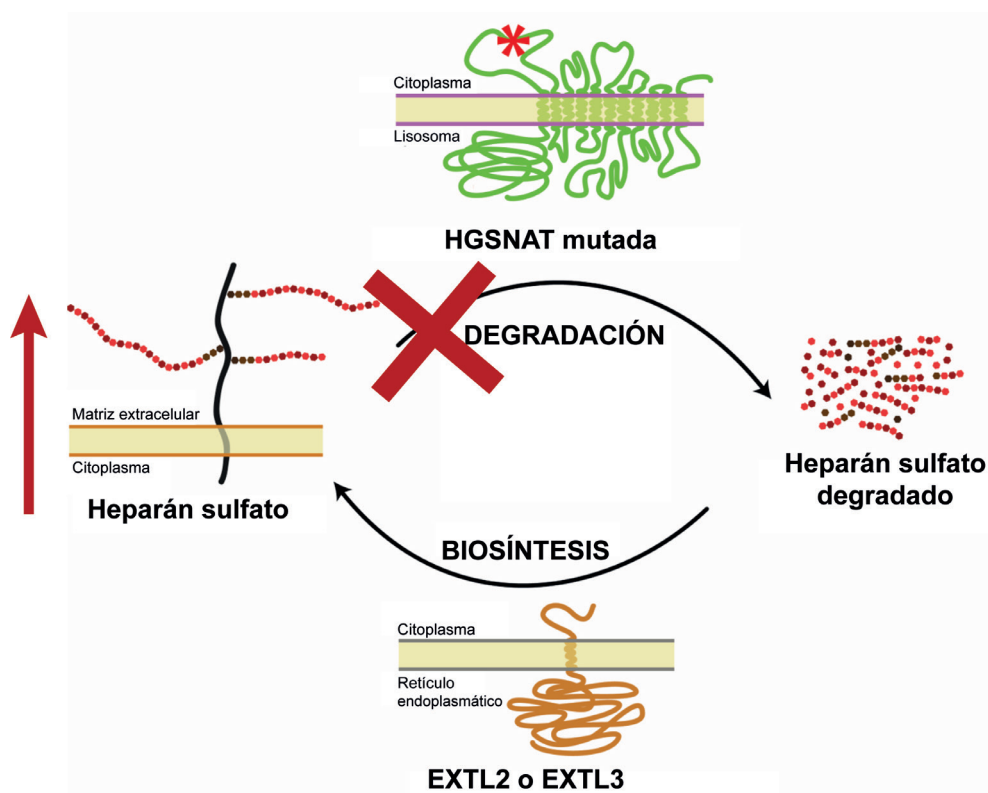


Figura 29. Bases moleculares del síndrome de Sanfilippo tipo C. Al encontrarse la enzima HGSNAT mutada, la degradación del HS se ve afectada y moléculas parcialmente degradadas de este GAG se acumulan causando la enfermedad. Enzimas implicadas en la síntesis del HS son, entre otras, EXTL2 y EXTL3.

Entre todas las posibles aproximaciones terapéuticas planteadas para el síndrome de Sanfilippo, el uso de pequeñas moléculas como terapia de reducción de sustrato (SRT) se ha demostrado que tenía algunos efectos positivos en trabajos previos (Malinowska et al, 2010; Roberts et al, 2007), e incluso algunas moléculas como la genisteína han llegado a evaluarse en ensayos clínicos (EudraCT 2013-001479-18; Piotrowska et al, 2008; Piotrowska et al, 2011). Pero la difícil obtención de estas moléculas en la naturaleza ha hecho plantearse también el uso de RNA de interferencia (RNAi) como agente de SRT.

El uso de siRNAs como SRT para el síndrome de Sanfilippo C ha sido evaluado en esta tesis doctoral (artículo 1). El objetivo era reducir la síntesis del HS, ya que su acúmulo es el desencadenante del fenotipo (Figura 29). En la síntesis del HS participan diferentes enzimas codificados por los genes de la familia EXT, pero como mutaciones en los genes implicados en su elongación, *EXT1* y *EXT2*, causan exostosis múltiple hereditaria, se deci-

dió inhibir genes *EXTL* (*EXT-like*). Estos genes codifican enzimas encargadas de iniciar el proceso de elongación del HS. Aunque hay un total de tres genes *EXTL*, dado que *EXTL1* no se expresa de forma ubicua en todos los tejidos y su función no ha sido del todo esclarecida, se decidió inhibir los genes *EXTL2* y *EXTL3*.

Estrategias usando RNAi como SRT han sido evaluadas previamente en dos ocasiones, usando distintos tipos celulares, modelos de Sanfilippo A. En una se usaron siRNAs para inhibir genes que codificaban enzimas implicadas en la formación de la región de unión del HS al proteoglicano (Dziedzic et al, 2010). Aquí se vio que a las 48h de la transfección de los siRNAs los mRNAs de cada gen se reducían alrededor de un 75%, y eso se correlacionaba con una reducción general de la síntesis de GAGs. En el segundo estudio se usaron shRNAs para inhibir *EXTL2* y *EXTL3* (Kaidonis et al, 2010), obteniendo los mejores resultados con shRNAs que inhibían la expresión de *EXTL2* hasta un 68% y reducían un 50% la síntesis de GAGs.

En este trabajo (artículo 1) se evaluaron un total de cuatro siRNAs, dos contra *EXTL2* y dos contra *EXTL3*, en fibroblastos de dos pacientes del síndrome de Sanfilippo C (Figura 30). En todos los casos se detectó una inhibición de aproximadamente un 95% en la expresión de los genes inhibidos, medida a los 3, 7, 10 y 14 días. En comparación a los trabajos previos, esta inhibición es mucho más pronunciada y duradera, indicando una mayor eficiencia de los siRNAs utilizados.

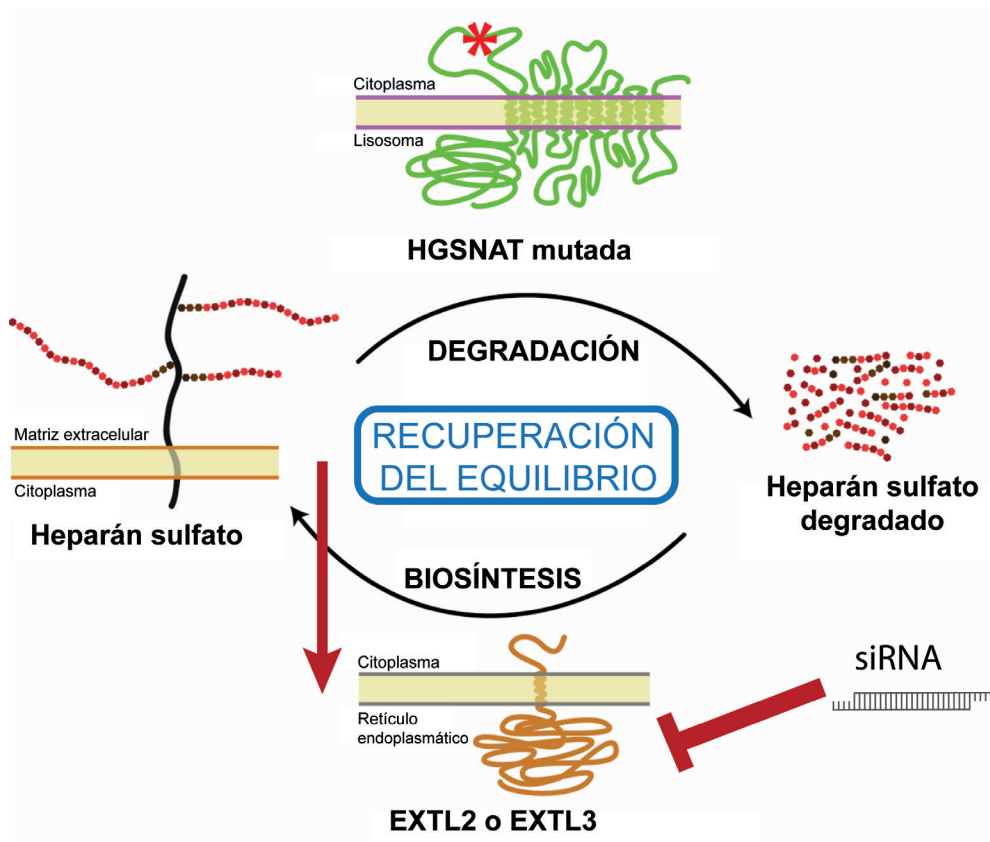


Figura 30. Esquema de la hipótesis de acción de los siRNAs como SRT para el síndrome de Sanfilippo C. Al inhibir los genes que codifican las proteínas EXTL2 o EXTL3, la biosíntesis del HS se ve reducida, y como su degradación también está afectada por las mutaciones en HGSNAT, se recupera el equilibrio entre biosíntesis y degradación.

A los tres días de tratamiento se evaluó la síntesis de glicosaminoglicanos (GAGs), y en ambas líneas de fibroblastos de pacientes se obtuvo una reducción de entre el 40% y el 60%, siendo más efectiva la inhibición del gen *EXTL2* (50-60%), sugiriendo que este gen podría ser una mejor diana terapéutica que *EXTL3*. Sin embargo, cabe destacar que los resultados obtenidos son referentes a la síntesis de GAGs en general, y no de HS en particular, por lo que las diferencias en la síntesis de HS podrían estar infravaloradas al medirse junto con la de otros GAGs. En el trabajo no se muestran las medidas de síntesis de GAGs a los 7 y 14 días, debido a que incluso en cultivos de fibroblastos no tratados esta síntesis se veía disminuida. Esto podría estar causado por el alto índice de crecimiento de los fibroblastos, que da lugar a una confluencia muy alta a los pocos días, lo cual deja entrever que el uso de otro modelo celular con una menor tasa de crecimiento podría resultar más útil para evaluar de forma más clara el efecto de los siRNAs a largo plazo.

Por otro lado, tanto a los 3, 7 como 14 días se midió la cantidad de GAGs en las células, y fue a los 14 días cuando una reducción de entre el 10 y el 20% se observó para todos los siRNAs. A los 14 días las cantidades de GAGs acumuladas eran mayores, por lo que la reducción también era más clara. Pero como pasaba con la síntesis de GAGs, el hecho de no medir la cantidad de HS en particular, si no la de GAGs en total, puede infravalorar las diferencias obtenidas.

Sin embargo, mediante inmunocitoquímica se pudo evaluar de forma específica la cantidad de HS presente en las células. Primero, se observaron claras diferencias entre la cantidad de HS presente en los fibroblastos de donantes sanos y los de ambos pacientes del síndrome de Sanfilippo C, siendo muy superior en estos últimos, como está descrito en la enfermedad. Y a continuación se compararon estos niveles con los de los pacientes tras 3 días de tratamiento con el siRNA-4899, el siRNA que mayor reducción en la síntesis de GAGs había causado. Los altos niveles de HS anteriormente detectados en pacientes se vieron reducidos a niveles similares a los detectados en los fibroblastos sanos, confirmando así la efectividad del tratamiento con siRNAs.

En conjunto, estos resultados indican el potencial de estos siRNAs contra los genes *EXTL* como SRT. Cabe destacar que los resultados obtenidos en ambas líneas de fibroblastos de pacientes fueron muy similares, incluso siendo portadores de mutaciones diferentes, dando robustez a los resultados. Asimismo, los resultados también sugieren que la SRT podría ser una estrategia útil para cualquier paciente de Sanfilippo, incluso de un subtipo diferente, ya que todos acumulan HS independientemente del gen mutado. Además, estos siRNAs tienen la capacidad de mantener bajos los niveles de mRNA de los genes *EXTL* durante al menos 14 días, una mejora muy considerable comparándolo con trabajos previos.

Aunque se requieren más estudios al respecto, estos resultados son prometedores y promueven el ensayo de terapias más a largo plazo. Por un lado, sería interesante el uso de shRNAs que pudieran producirse de forma constitutiva, por ejemplo, al estar integrados en el genoma, y hacer estudios más a largo plazo ya que su producción se mantendría estable en el tiempo. Sin embargo, la integración genómica puede causar alteraciones indeseadas, que además variarían entre células, ya que en cada caso el shRNA se integraría en un sitio. Por otro lado, se podrían usar siRNAs en tipos celulares con menor tasa de crecimiento, para evitar fenómenos de dilución de dicho compuesto terapéutico y también para impedir

que la alta confluencia afecte a la tasa de síntesis de distintos GAGs y con ello a los resultados. Un buen modelo celular por su baja tasa de división podrían ser las neuronas, que tal como se describe más abajo han sido uno de los tipos celulares centrales en este trabajo, junto con los astrocitos. Además, aparte de que el tratamiento con siRNAs puede verse favorecido por el hecho de que su tasa de división es muy baja, los resultados obtenidos serían más extrapolables que los de fibroblastos al ser Sanfilippo una enfermedad principalmente neurodegenerativa.

Según los resultados de nuestro estudio (artículo 1) la inhibición del gen *EXTL2* reduce más la síntesis de GAGs que la inhibición de *EXTL3*, por lo que *EXTL2* parece ser una mejor diana terapéutica, aunque la diferencia no sea demasiado grande. Sin embargo, se ha sugerido que en hígado de ratón *EXTL2* podría participar en la terminación de la elongación del HS (Nadanaka et al, 2013b), y que ratones deficientes en esta enzima producían más cantidad de HS en la regeneración del hígado (Nadanaka et al, 2013a), aunque eran completamente compatibles con la vida. Tanto los resultados de nuestro estudio (artículo 1) como los publicados anteriormente (Kaidonis et al, 2010) no respaldan esta sugerencia, ya que se observa que al inhibir *EXTL2* se obtiene una reducción en la síntesis y acúmulo de HS. También es importante destacar que mutaciones en *EXTL3* se han relacionado recientemente con alteraciones neurológicas, del desarrollo, inmunitarias y esqueléticas (Oud et al, 2017; Volpi et al, 2017), y el modelo murino deficiente en *EXTL3* es incompatible con la vida (Takahashi et al, 2009). Por ello, la elección del gen *EXTL2* como diana para la SRT con RNAi parece seguir siendo una mejor opción, aunque serían necesarios más estudios para dilucidar la función o funciones que puede desempeñar *EXTL2* en distintos tipos celulares.

Teniendo en cuenta que la SRT basada en siRNAs no promueve la eliminación completa del acúmulo de HS, sino una reducción parcial, sería interesante combinar esta estrategia terapéutica con alguna otra. Por ejemplo, aumentando la excreción o degradación del HS en las células, mediante la sobreexpresión de TFEB o el uso de glucosamina como chaperona.

Sin embargo, aunque los resultados de SRT con siRNAs en fibroblastos sean esperanzadores, un aspecto crucial en el desarrollo de una terapia es la disponibilidad de modelos de enfermedad que permitan poner de manifiesto que esa terapia es segura y eficaz. Existen diferentes modelos animales del síndrome de Sanfilippo, como un modelo murino del subtipo B (Li et al, 1999) o también dos del subtipo C (Marcó et al, 2016; Martins et al, 2015). Aunque estos modelos recapitulan muchos de los síntomas típicos de la enfermedad en humanos, como acúmulo de HS, menor esperanza de vida o alteraciones comportamentales que se agudizan con la edad, cabe destacar que ninguno de ellos manifiesta síntomas similares a la neurodegeneración encontrada en humanos. Los modelos murinos, aunque herramientas útiles, no reproducen en muchos aspectos un cerebro humano, cuyas células son mucho más complejas tanto a nivel morfológico como funcional. Es por ello que, considerando que el síndrome de Sanfilippo es una enfermedad neurodegenerativa, el uso de modelos celulares neurales humanos puede aportar información útil y complementaria que en modelos animales podría ser difícil de obtener.

Previamente, en nuestro grupo, se generaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (Canals et al, 2015). Estas fueron derivadas de los fibroblastos de pacientes en los que se han probado los siRNAs como SRT (artículo 1), así como de fibroblastos de do-

nantes sanos (Figura 31). Usando estas últimas iPSCs con fenotipo sano (llamadas iPSCs WT), y mediante el uso de la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9, se generaron en esta tesis doctoral (artículo 2) dos nuevas líneas de iPSCs con mutaciones en el gen *HGSNAT*, isogénicas a la línea de iPSCs WT (Figura 31). El objetivo del presente trabajo era obtener iPSCs humanas isogénicas que pudieran ser diferenciadas al tipo celular de interés, pero que excluyeran la presencia de cambios fenotípicos causados por diferencias en el fondo genético, en vez de por las mutaciones causales de la patología, en este caso las del gen *HGSNAT* (Figura 31). La idea inicialmente planteada para la generación de iPSCs isogénicas era corregir las mutaciones ya presentes en las líneas derivadas de fibroblastos de pacientes. Sin embargo, la ausencia de buenos sgRNAs cercanos a estas mutaciones hizo que se tuviera que cambiar de estrategia e inducir mutaciones en las iPSCs WT.

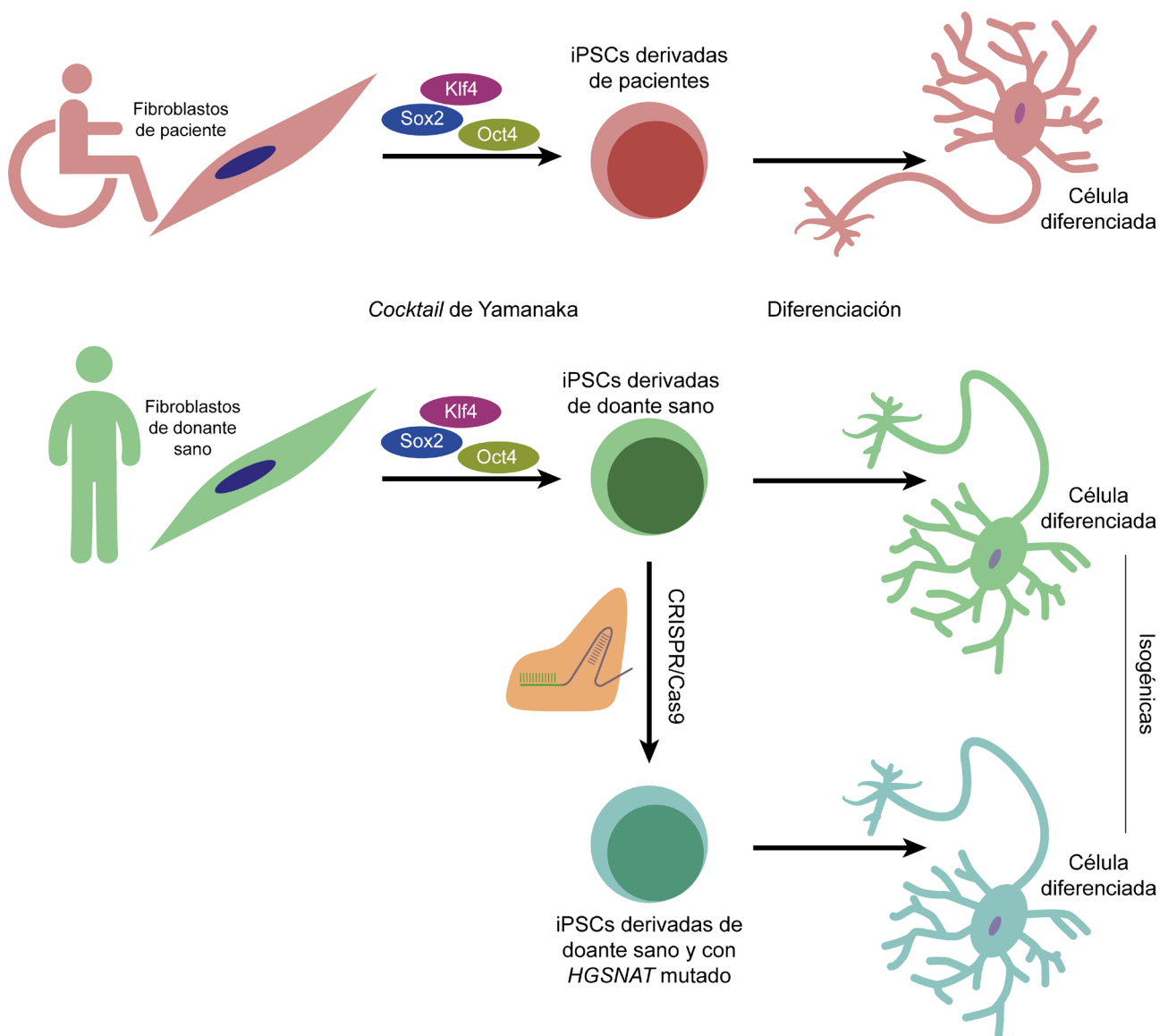


Figura 31. Esquema de la generación de iPSCs de pacientes y donantes sanos, y la estrategia a seguir para la generación de líneas isogénicas mediante CRISPR/Cas9.

El uso de la tecnología iPSCs es de gran utilidad ya que permite obtener diferentes tipos celulares, incluyendo aquellos más relevantes para la enfermedad a estudiar, como los tipos celulares neurales en el caso del síndrome de Sanfilippo. En cualquier otro caso, las limitaciones éticas y técnicas que supone la obtención directa de tipos celulares neurales de cerebros humanos dificultan la investigación a este nivel.

En el segundo trabajo presentado en esta tesis doctoral (artículo 2) se introdujeron en las iPSCs WT los componentes del sistema CRISPR/Cas9 para la edición génica en forma de ribonucleoproteína (RNP). Este formato confiere diferentes ventajas respecto a la liberación de los componentes mediante el uso de vectores, como evitar depender de mecanismos celulares como la transcripción o la traducción para poder llegar al núcleo y realizar el corte en el DNA, además de que al estar menor tiempo en la célula se reducen mucho las posibilidades de ediciones fuera de la secuencia diana (*off-targets*) (DeWitt et al, 2017).

Para dirigir al sistema CRISPR/Cas9 se usó un sgRNA dirigido al exón 2 del gen *HGSNAT*. Debido a que no se buscaba la obtención de ninguna mutación en concreto tras la acción de la nucleasa Cas9, sino únicamente la disrupción del gen y con ello la alteración de la actividad de HGSNAT, se optó por dejar que la propia maquinaria celular generara mutaciones de forma aleatoria en su intento de reparar los cortes, mediante el mecanismo de *non-homologous end joining* (NHEJ). Esta estrategia, ya que es la que actúa por defecto en la célula, es más eficiente, aunque las mutaciones que se producen son más variables.

Del conjunto de células obtenido se seleccionó inicialmente un clon heterocigoto, con un alelo sin mutar y otro con una delección de 16 pb (p.N66Gfs*15). Partiendo de este clon, se aplicó de nuevo la tecnología CRISPR/Cas9 para finalmente obtener dos clones heterocigotos compuestos, ambos con la delección de 16 pb en un alelo. Respecto al otro alelo, en el clon HGSNAT1 se había generado una inserción de dos pares de bases (p.Y70Hfs*17), y el clon HGSNAT2 presentaba un reordenamiento complejo (p.Y70*). Todas las mutaciones generadas causan una alteración en la pauta de lectura provocando la aparición de un codón de parada prematuro. Teniendo en cuenta que la proteína HGSNAT tiene 635 aminoácidos, las proteínas mutadas obtenidas son casi un 90% más cortas, y al medir su actividad en comparación con las iPSCs WT, las iPSCs HGSNAT1 y HGSNAT2 tienen alrededor de un 80% menos, alcanzando valores muy similares a los detectados en iPSCs derivadas directamente de pacientes (Canals et al, 2015).

Se confirmó también que ambas líneas de iPSCs obtenidas seguían siendo pluripotentes, y conservaban su potencial de diferenciación a las tres capas embrionarias. Este hecho convierte a estas tres líneas isogénicas, las dos con mutaciones en *HGSNAT* y la línea de iPSCs WT, en herramientas muy útiles para generar modelos del síndrome de Sanfilippo C. Concretamente, como se comentó anteriormente, al tratarse de una enfermedad neurodegenerativa sería muy interesante diferenciar estas iPSCs a tipos celulares neurales para poder identificar potenciales aproximaciones terapéuticas y analizar posibles tratamientos para esta enfermedad. Además, al tratarse de líneas isogénicas, los resultados obtenidos usando estos modelos serían más robustos.

Para diferenciar iPSCs existen protocolos muy diferentes según el tipo celular que se quiera obtener, pero la mayoría de ellos suelen ser muy largos y complejos. Además, la población obtenida suele ser una mezcla de distintos tipos celulares, incluso precursores, que

dificultan la obtención de resultados robustos al comparar distintas líneas. En este trabajo se querían obtener líneas celulares neurales para estudiar el síndrome de Sanfilippo C. Aunque clásicamente las neuronas han sido el tipo celular más estudiado del sistema nervioso central (CNS), en los últimos años diferentes investigaciones han destacado el papel de las células de glía, y en concreto de los astrocitos, en la regulación de la homeostasis y funciones cerebrales (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

En el artículo 3 de esta tesis doctoral se presenta la generación de modelos celulares relevantes para el síndrome de Sanfilippo C mediante el uso de protocolos de diferenciación basados en la sobreexpresión de factores de transcripción. En concreto, se usaron protocolos previamente descritos para una diferenciación rápida y eficiente de iPSCs a líneas puras de neuronas (Zhang et al, 2013) y astrocitos (Canals et al, 2018) (Figura 32). En este trabajo (artículo 3), las neuronas y astrocitos obtenidos no se mantienen en cultivo tanto tiempo como para que su maduración sea completa, aunque sí que están completamente diferenciadas.

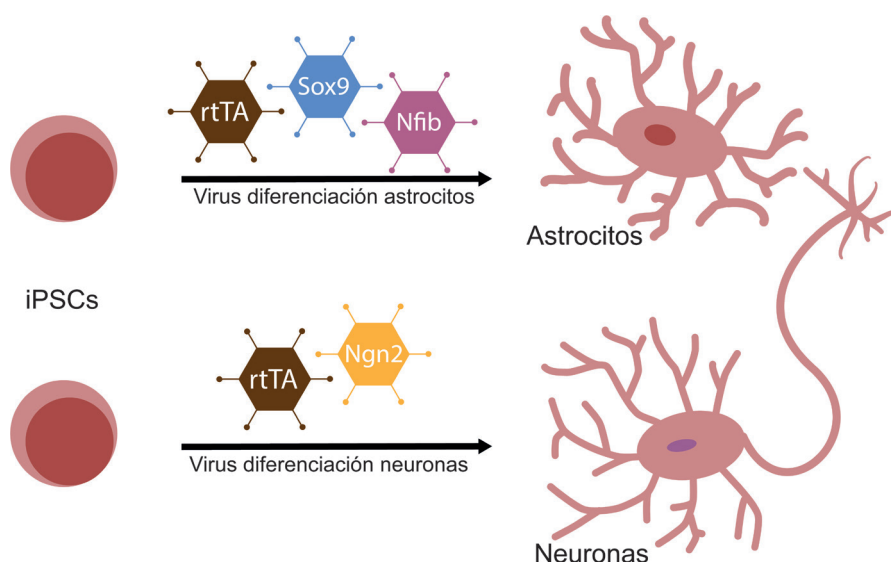


Figura 32. Diferenciación de las iPSCs a astrocitos o neuronas mediante la sobreexpresión de factores de transcripción. Se usaron lentivirus para la introducción de estos factores.

En el caso de las neuronas inducidas (iNs) (Zhang et al, 2013), existen diferentes formas de mantenerlas. Actualmente muchos estudios mantienen estas iNs solas en cultivo durante un periodo variable según su objetivo (Wu et al, 2019). También hay casos en los que se estas iNs son mantenidas tanto solas como en cocultivo con células gliales dependiendo del experimento a analizar, ya que en el primer caso se obtendrían iNs puras, pero en el segundo se generarían sinapsis funcionales (Li et al, 2019a). Otra opción sería mantener estas iNs en un medio previamente condicionado por células gliales, aunque este medio no proporcionaría las mismas ventajas del cocultivo, ya que las neuronas no tendrían la asistencia directa las células de glía, sino solo de los factores liberados por estas, que ayudarían a su maduración. Además, la proporción de estos factores en el medio condicionado sería muy variable cada vez, debido tanto al tiempo de condicionamiento como a su estabilidad en el tiempo.

Dado que el objetivo del estudio presentado en esta tesis doctoral (artículo 3) es generar un modelo celular de forma fácil y rápida, se decidió mantener las iNs solas. En caso de haber realizado cocultivos, se habría perdido la pureza de las iNs y se habrían incrementado tanto la dificultad como el tiempo de desarrollo del protocolo. Con el uso de medio condicionado, que además es más difícil de obtener, se habría aportado una variabilidad innecesaria al experimento, dificultando la interpretación de los resultados. En el presente estudio se estableció mantener las iNs en cultivo durante 10 días, un periodo suficiente para obtener una población pura de neuronas completamente diferenciadas, aunque no en su mayor estado de maduración, pero en las que ya se pueden realizar estudios fenotípicos específicos de tipo celular.

Los astrocitos inducidos (iAs) (Canals et al, 2018) también fueron mantenidos 10 días en cultivo, y solos, que es lo común para este tipo celular. En este periodo se consigue una población pura de astrocitos, que aún no ha alcanzado su plena madurez, pero cuya diferenciación es completa. Esto se comprueba en el protocolo original, en el que al analizar los astrocitos a los 7 días de diferenciación no se detectan la totalidad de funciones asociadas a este tipo celular maduro, pero sí una morfología claramente astrocítica y la presencia de diferentes marcadores específicos de este tipo celular. Como pasaba con las iNs, un modelo celular puro de iAs tras 10 días de diferenciación permite el estudio en este tipo celular en concreto de fenotipos específicos de forma rápida.

Aunque se haya elegido realizar la diferenciación tanto de iNs como de iAs a 10 días, bien es cierto que esta estrategia también tiene sus limitaciones. Por un lado, no se pueden detectar fenotípicos asociados a la enfermedad más a largo plazo. Además, al no ser células completamente maduras, muchos fenotipos aberrantes pueden no llegar a manifestarse. Por otro lado, puede que si se combinaran ambos tipos celulares en cocultivo se detectarían nuevos comportamientos intercelulares de interés para los mecanismos patológicos de la enfermedad. También, en la evaluación de estrategias terapéuticas puede que no se detecten mejoras fenotípicas debido al corto periodo de exposición y no tanto a la baja efectividad de dicha terapia. Igualmente, también cabe destacar que, aunque los protocolos de diferenciación basados en la sobreexpresión de factores de transcripción presenten ventajas como una mayor eficiencia y rapidez, así como la obtención de líneas celulares más puras, también tienen inconvenientes. El que se puede destacar principalmente es que esta diferenciación es forzada y por lo tanto se salta pasos básicos que sí se dan en el desarrollo, por lo que problemas en estas etapas del desarrollo no se manifestarán.

En este trabajo se diferenciaron 4 líneas celulares diferentes de iPSCs tanto a iNs como iAs. Por un lado, se usaron las dos líneas isogénicas generadas mediante CRISPR/Cas9 en el trabajo anterior (artículo 2) (iPSCs HGSNAT1 e iPSCs HGSNAT2), así como la línea de iPSCs WT a partir de la cual fueron generadas. Además, también se decidió usar una de las líneas de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes del síndrome de Sanfilippo C obtenida en el mismo proyecto que las iPSCs WT (Canals et al, 2015), la línea iPSCs SFC6. Esta línea es heterocigota compuesta para una mutación de *splicing* (c.633+1G > A) y una mutación *missense* (c.1334T > C; p.L445P). El uso de estas cuatro líneas celulares hace que los resultados obtenidos sean más robustos. Principalmente, por el hecho de disponer tanto de iPSCs derivadas de pacientes como obtenidas mediante CRISPR/Cas9, pero también porque entre las iPSCs HGSNAT1, HGSNAT2 y WT no hay variabilidad debi-

da al fondo genético por ser líneas isogénicas. Además, cabe puntualizar que las líneas de iPSCs WT y SFC6 fueron generadas usando el mismo método de reprogramación, algo a destacar ya que el uso de distintos métodos habría introducido variabilidad.

Tras los 10 días de diferenciación de las 4 líneas de iPSCs tanto a iNs como a iAs, se valoró la presencia de marcadores específicos de tipo celular, tanto por PCR cuantitativa a tiempo real como por inmunocitoquímica. En ambos casos los resultados confirmaron la correcta diferenciación de las iPSCs a los tipos celulares deseados. Además, también se pudo comprobar la presencia de una correcta morfología celular en ese punto de la diferenciación.

Es interesante remarcar que no se detectaron diferencias significativas entre líneas celulares en cuanto a su capacidad de diferenciación, sugiriendo que las mutaciones causantes del síndrome de Sanfilippo C no perjudican el potencial de diferenciación de las iPSCs mediante estos protocolos. Esto no es sorprendente ya que, como se ha comentado, la sobreexpresión de estos factores de transcripción promueve una diferenciación directa, saltándose muchos pasos clave del desarrollo embrionario que podrían resultar críticos en los pacientes. En el trabajo de Canals et al, 2015 se diferenciaron tanto las iPSCs SFC6 como WT a un conjunto de neuronas y células de glía mediante protocolos basados en el desarrollo embrionario, y tampoco se detectaron diferencias en el potencial de diferenciación entre líneas. Estos resultados previos parecen confirmar que tanto las diferenciaciones a neuronas como a astrocitos no están afectadas por las mutaciones en *HGSNAT*.

Una vez confirmada la correcta diferenciación a los tipos celulares deseados, se usaron las iNs para realizar un examen más exhaustivo y comprobar si las líneas con mutaciones en *HGSNAT* recapitulaban fenotipos específicos del síndrome de Sanfilippo C.

En primer lugar, se compararon los niveles de HS entre las iNs WT y las iNs con mutaciones en *HGSNAT*, y efectivamente las iNs mutadas presentaban 3,5 veces más cantidad de HS que las iNs WT. Cabe destacar que, aunque la diferencia es considerable, los resultados obtenidos no fueron significativos debido a la variabilidad entre muestras, seguramente debido a que se hicieron las medidas en días distintos por limitaciones técnicas. Por ello, sería interesante analizar un mayor número de muestras de cada línea para confirmar la existencia de diferencias significativas entre las iNs.

En el estudio de Canals et al, 2015 se describió la diferenciación de iPSCs de pacientes del síndrome de Sanfilippo a un conjunto de células neurales, y se vio como a las 9 semanas de diferenciación se detectaban 2 veces más GAGs en las células neurales de pacientes que en las WT. Este es un valor bastante inferior al obtenido en este proyecto, en el que a los 10 días de diferenciación se detectó un incremento en el HS de 3,5 veces. Esta diferencia detectada puede tener diferentes explicaciones. Por un lado, en el presente proyecto se mide específicamente el HS, mientras que en Canals et al, 2015 se usó un kit para cuantificar un total de 5 tipos de GAGs, lo cual puede provocar una infravaloración de las diferencias en HS. Por otro lado, en este trabajo se han diferenciado las iPSCs a una población pura de iNs, mientras que en Canals et al, 2015 se obtiene un conjunto heterogéneo de células neurales, incluyendo tanto glía como distintos subtipos neuronales, existiendo la posibilidad de que la tasa de acúmulo del HS en iNs sea superior a la de otros tipos celulares neurales, como los astrocitos. Para arrojar luz en este aspecto, sería de gran interés analizar los niveles de acúmulo de HS en los iAs generados en este estudio. Por último,

también cabe la posibilidad de que el protocolo usado en el presente trabajo, además de agilizar la obtención de iNs, acelere la aparición del fenotipo en comparación al usado en Canals et al, 2015.

Por otra parte, además de medir los niveles de HS, también se realizaron cuantificaciones de los lisosomas presentes en los somas de las distintas iNs mediante análisis inmunocitoquímicos, ya que un incremento de estos está asociado con la enfermedad. En primer lugar, se midió el área ocupada por LAMP2 (marcador de lisosomas) en relación a Tuj1 (marcador de soma), detectando un incremento significativo del 8% en las iNs HGS-NAT2 respecto a las WT, pero no en las otras líneas. En Canals et al, 2015 se detectó para este mismo experimento un 20% de incremento al comparar el área de LAMP2 entre las neuronas derivadas de pacientes y las WT, pero a las 9 semanas de diferenciación. Los resultados obtenidos en el presente proyecto podrían indicar una tendencia hacia el incremento del tamaño y/o número de lisosomas en las líneas con mutaciones en *HGSNAT*, pero debido a que la diferenciación llevada a cabo ha sido mucho más corta que la de Canals et al, 2015, un análisis más a largo plazo podría confirmar si tras un mayor tiempo en cultivo las diferencias detectadas serían más tangibles. Se están realizando análisis preliminares del área ocupada por LAMP2 en iAs y los resultados parecen indicar que tampoco habría grandes diferencias, como en iNs.

Relacionado con este tema, también se realizaron medidas de intensidad de LAMP2 en las iNs. En este caso los resultados parecen indicar una tendencia hacia un incremento de la intensidad cuando las células están mutadas, sugiriendo un mayor número y/o tamaño de los lisosomas presentes en una misma área. Sin embargo, sería necesario analizar un mayor tamaño muestral para confirmar estos resultados. Igualmente, junto con los resultados anteriores, esta tendencia podría significar que, aunque las iNs mutadas tengan un mayor acúmulo de HS y esto haya inducido una mayor biogénesis lisosomal, estos nuevos orgánulos siguen estando localizados en la misma área, en dónde la intensidad de LAMP2 es superior. A pesar de todo, esto no es más que una hipótesis, y para confirmarla habría que dejar las iNs más tiempo en cultivo para ver si se genera un incremento en los lisosomas y esto induce a su expansión por el resto de la célula, generando un aumento claro en el área ocupada por LAMP2.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se podría profundizar más en distintos aspectos. En primer lugar, sería interesante realizar los mismos experimentos planteados para iNs pero en iAs, dado que conocer los niveles de acúmulo de HS así como el incremento o no de sus lisosomas ayudaría a entender los resultados obtenidos, aparte de implicar la caracterización de un nuevo modelo celular neural para el síndrome de Sanfilippo C. Por otro lado, un análisis más a largo plazo de las iNs, así como de los iAs, podría aclarar si es cuestión de tiempo que haya un mayor aumento lisosomal (intensidad de LAMP2) y que esto implique una expansión más clara de este orgánulo por la célula (área de LAMP2). También se podrían realizar estos experimentos con medio condicionado por astrocitos, para poder alargar aún más la vida en cultivo de estas células.

Finalmente, y para realizar una mejor comparativa con los resultados que se obtuvieron en Canals et al, 2015, una vez tanto las iNs como los iAs estén completamente caracterizados se podrían realizar cocultivos de estos dos tipos celulares. Con ello se podría analizar,

entre otras cosas, el acúmulo de HS y el comportamiento lisosomal con el tiempo, así como las interacciones que tienen estos dos tipos celulares en una situación de enfermedad frente a salud. Por ejemplo, puede que los iAs ayuden inicialmente a las iNs a deshacerse del exceso de HS en un intento de mantener su homeostasis. Esto se podría estudiar viendo si existe, por ejemplo, algún tráfico de vesículas entre ambos tipos celulares, dónde se podría transportar HGSNAT mutado de los iAs a las iNs, o exceso de HS de las iNs a los iAs, con el objetivo de alargar la vida neuronal. Si se descubriera algún mecanismo similar a este, se podría explorar la opción de que astrocitos sanos ayudaran a paliar el fenotipo típico de Sanfilippo C, abriendo las puertas a una nueva estrategia de terapia celular.

Una posible estrategia sería el trasplante de astrocitos sanos en el CNS. Este procedimiento se ha realizado trasplantando astrocitos humanos en el cerebro de ratones inmunodeprimidos para crear ratones quimera (Han et al, 2013). Curiosamente, en el cerebro de estos ratones se vio como la mayoría de las células gliales de ratón eran reemplazadas por las humanas y sus progenitores afectando también a funciones neurofisiológicas (Windrem et al, 2014). Sería interesante ver si al trasplantar astrocitos sanos en el CNS de ratones modelo del síndrome de Sanfilippo C (Marcó et al, 2016; Martins et al, 2015), estos astrocitos colonizan el CNS y revierten los fenotipos asociados a la enfermedad. Este supuesto confirmaría la existencia de interacciones entre neuronas y astrocitos que tendrían como objetivo alargar la vida neuronal en el contexto del síndrome de Sanfilippo C. El siguiente paso sería explorar esta opción en humanos.

Volviendo a los resultados obtenidos en la caracterización de la iNs como modelo del síndrome de Sanfilippo C, se puede concluir que, aunque no den significativos, presentan una tendencia clara, principalmente en lo que al aumento del acúmulo de HS se refiere. Por ello, se decidieron emplear estos modelos neurales en la evaluación de la estrategia terapéutica SRT basada en siRNAs anteriormente testada en fibroblastos (artículo 1), ya que allí los resultados obtenidos fueron prometedores y ahora se dispone de tipos celulares mucho más relevantes en la enfermedad (Figura 33).

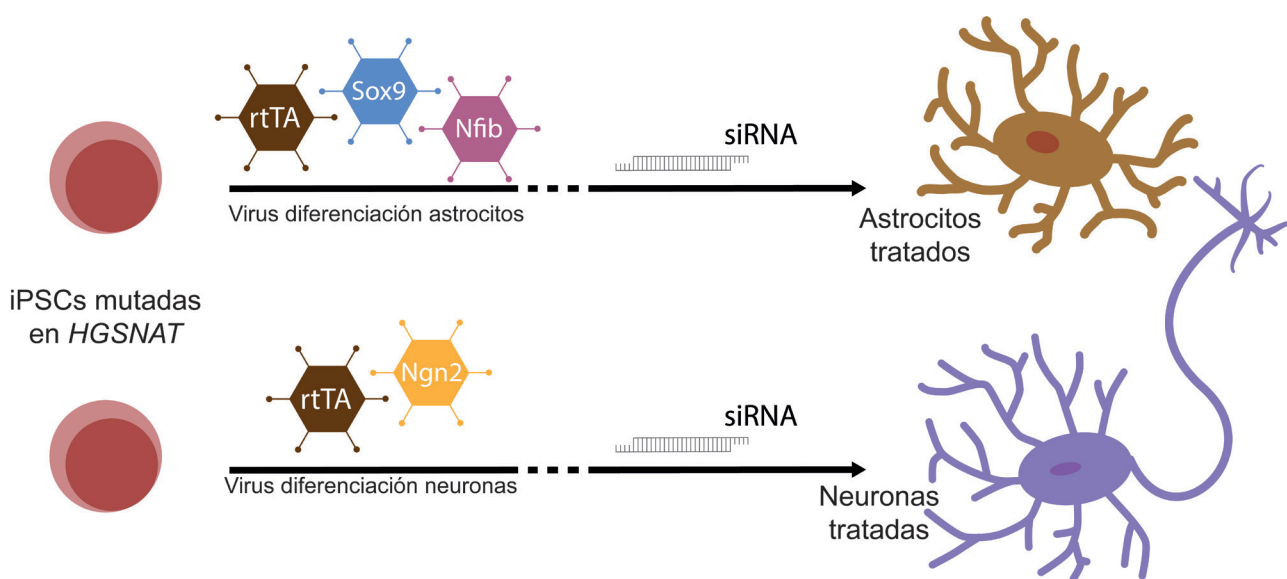


Figura 33. Esquema de la diferenciación de iPSCs a neuronas o astrocitos, y como en ese periodo de diferenciación estas células también son tratadas con siRNAs contra el gen *EXTL2* como SRT.

Debido a que los cuatro siRNAs testados en fibroblastos reducían alrededor de un 95% la cantidad de mRNAs de los genes *EXTL2* y *EXTL3*, se escogió el más eficiente para la evaluación con los nuevos modelos. El siRNA-4899, que inhibe la expresión del gen *EXTL2*, fue el que había generado una mayor reducción de la síntesis de GAGs a los 3 días de tratamiento. Además, mediante inmunocitoquímica también se demostró que este siRNA reducía claramente y de forma específica los niveles de HS de los fibroblastos a los 3 días de tratamiento.

En primer lugar, mediante PCR cuantitativa a tiempo real se evaluó la eficiencia del siRNA-4899 tanto en iNs como en iAs. Aunque la caracterización fenotípica de los iAs no fue llevada a cabo, se quiso comprobar también que el siRNA-4899 era eficiente en este tipo celular de cara a futuros estudios. En coherencia con los resultados obtenidos previamente en fibroblastos, la reducción del mRNA de *EXTL2* tanto en iNs como en iAs fue de alrededor del 75%. Las variaciones en el % de inhibición del siRNA entre los modelos neurales y los fibroblastos pueden ser debidas, por ejemplo, a diferencias en los mecanismos intrínsecos de cada tipo celular o a la eficiencia de transfección. Igualmente, los niveles de inhibición siguen siendo suficientemente elevados.

Solo las iNs habían sido completamente caracterizadas fenotípicamente como modelos del síndrome de Sanfilippo C, por lo que se escogió una de las líneas con mutaciones en *HGSNAT* para ser diferenciada a iNs y ver el efecto del siRNA. Se escogió la línea HGSNAT2, por haber obtenido con ella resultados menos variables. De los tres parámetros analizados en relación al fenotipo de Sanfilippo, se seleccionó la cuantificación del HS para realizar una primera aproximación acerca de la efectividad del siRNA en esta línea celular, ya que es el resultado más interesante debido a que implica directamente al HS, cuya síntesis se está inhibiendo. Sorprendentemente, a los 3 días de haber transfectado las iNs HGSNAT2 con el siRNA-4899 los niveles de HS no se habían reducido en absoluto.

Diferentes factores pueden dar explicación a estos contradictorios resultados. Por un lado, debido a diferencias intrínsecas de cada tipo celular, como su tasa de división, puede que las iNs presenten una menor capacidad para eliminar el HS almacenado hasta el momento en comparación a los fibroblastos, por lo que un tratamiento más a largo plazo podría dar resultados distintos. Por otro lado, la capacidad de eliminación del HS ya almacenado también estará relacionada con la actividad residual de *HGSNAT*, que puede depender de la mutación presente en cada línea, además de la expresión en cada tipo celular. Puede ser que la expresión de *HGSNAT* en iNs siga siendo tan baja que en este tipo celular la tasa de eliminación del HS acumulado sea demasiado lenta, reduciendo la eficiencia de la SRT. También puede que las mutaciones presentes en la línea HGSNAT2 (heterocigota compuesta para dos mutaciones *nonsense*) impidan incluso que haya actividad basal de la enzima por generar un codón de parada tan temprano. O puede que suceda una combinación de todas las posibles causas.

Para dilucidar qué está pasando, en primer lugar se podría medir la actividad de *HGSNAT* tanto en iNs HGSNAT2 como en alguna línea derivada de pacientes como referencia, por ejemplo iNs SFC6 (heterocigota compuesta para una mutación de *splicing* y una *mis-sense*), ya que fue una de las líneas usadas en el estudio de la SRT en fibroblastos. Además, si hay variaciones en la actividad basal de *HGSNAT* en iNs SFC6 en comparación a

iNs HGSNAT2, se podría ver el efecto del siRNA en iNs SFC6 y ver si aumenta la eficiencia de la SRT. También sería interesante ver los resultados en un tratamiento más a largo plazo o si la actividad basal de HGSNAT aumenta al diferenciar estas líneas a otros tipos celulares, como los iAs. También es cierto que los iAs tienen una mayor tasa de división que las iNs, lo que por un lado hace que los siRNAs se diluyan con más rapidez perdiendo su efecto a largo plazo, pero que al mismo tiempo ayuda a que el acúmulo de HS también se elimine con mayor facilidad.

Si se dieran indicios de que la SRT puede resultar efectiva más a largo plazo, bien en iNs y/o en iAs, se podría generar un shRNA basado en el siRNA-4899 y codificarlo en un plásmido con replicación autónoma y que no se inserte, para así evitar su dilución con el tiempo y la creación de mutaciones indeseadas debido a la inserción aleatoria. Este plásmido podría encapsularse en un AAV con fuerte neurotropismo, como el AAV-TT (Tordo et al, 2018), para llegar con facilidad al CNS y transfectar las células neurales, las más afectadas en el síndrome de Sanfilippo.

Por otro lado, también cabría destacar los estudios que relacionan el gen *EXTL2* con la supresión de la biosíntesis del HS en células de hígado de ratón (Nadanaka et al, 2013a; Nadanaka et al, 2013b). Puede que la función de *EXTL2* varíe según el tipo celular, y puede que en fibroblastos actúe como iniciador de la elongación en la biosíntesis del HS, mientras que en iNs tenga el mismo papel que el descrito en células de hígado de ratón. En este caso, la no reducción en la cantidad de HS detectada después de la transfección con el siRNA se explicaría por en realidad no haber inhibido un iniciador de la elongación del HS, sino puede que un supresor de su biosíntesis. Futuros estudios deberán clarificar cual es realmente la función de *EXTL2* según el tipo celular para poder así plantear mejores estrategias terapéuticas basadas en SRT.

Debido a los resultados obtenidos, otra propuesta interesante sería probar alguno de los siRNAs contra *EXTL3* como SRT, siempre teniendo en cuenta que mutaciones en este gen se han relacionado recientemente con alteraciones neurológicas, del desarrollo, inmunitarias y esqueléticas (Oud et al, 2017; Volpi et al, 2017).

De este estudio (artículo 3) se podría concluir que los protocolos de diferenciación basados en la sobreexpresión de factores de transcripción son útiles para la generación rápida y eficiente de modelos celulares *in vitro*. Y, sin duda, la obtención de buenos modelos de enfermedad es necesaria para realizar estudios más profundos de los mecanismos de la enfermedad en tipos celulares relevantes, así como para una mejor valoración de estrategias terapéuticas.

Aunque esta tesis doctoral se ha centrado en la generación de nuevos modelos y en el estudio de una aproximación terapéutica para el síndrome de Sanfilippo C, las estrategias utilizadas para ese fin son aplicables también a otras enfermedades. Por ello, se inició de nuevo el proceso para la generación de iPSCs con mutaciones en el gen *NAGLU*, causantes del síndrome de Sanfilippo B (artículo 4), con la finalidad de generar modelos relevantes para esta enfermedad.

Para ello, se usaron de nuevo las iPSCs WT obtenidas en el trabajo de Canals et al, 2015 para generar dos líneas de iPSCs con mutaciones en el gen *NAGLU* mediante la tec-

nología de edición génica CRISPR/Cas9. Las líneas obtenidas son no solo isogénicas en relación a las iPSCs WT, sino también a las iPSCs obtenidas en el artículo 2, iPSCs HGSNAT1 y HGSNAT2.

A diferencia de las iPSCs generadas en el artículo 2, en la que tras la edición génica las proteínas HGSNAT resultantes eran aproximadamente un 90% más cortas en todos los casos, aquí se decidió caracterizar dos clones cuyos cambios a nivel proteico fueran distintos en cada línea. Se buscaba obtener una línea con mutaciones truncantes en *NAGLU*, y otra con cambios menos drásticos a nivel proteico, que en la medida de lo posible preservaran una mínima actividad residual. Con estos clones se podría optimizar un estudio de SRT similar al presentado en el artículo 3, donde no se apreciaba reducción del acúmulo de HS tras el tratamiento. Y es que una de las hipótesis planteadas para justificar estos resultados negativos es que la ausencia total de actividad enzimática impide un reciclado basal del HS ya acumulado.

El proceso a seguir para obtener las nuevas líneas isogénicas fue el mismo que en artículo 2, es decir, se transfectó el complejo de ribonucleoproteína a las iPSCs WT para generar mutaciones aleatorias mediante NHEJ. En este caso se usó un sgRNA dirigido al exón 5 del gen *NAGLU* y, tras el análisis mutacional, se seleccionaron dos clones para caracterizar. El clon llamado NAGLU3 presenta una delección de 9 pb en homocigosis, lo cual resulta en la pérdida de 3 aminoácidos (p.F288_I290del) de los 743 aminoácidos totales presentes en la proteína NAGLU. Por otro lado, el clon NAGLU4 es homocigoto para una inserción de 1 pb que causa una alteración en la pauta de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro (p.F288Ifs*27) dando como resultado una proteína más corta, de 315 aminoácidos, un poco menos de la mitad de la proteína original.

Para ver las consecuencias de ambas mutaciones, se midió la actividad de NAGLU tanto en iPSCs como en iNs tras 10 días de diferenciación (Zhang et al, 2013), para evitar así las dudas generadas en el desarrollo del artículo 3 acerca de si la baja eficacia de la SRT en iNs era, entre otras cosas, debida a una extremadamente baja actividad de HGSNAT en comparación a otros tipos celulares o mutaciones. Curiosamente, las iPSCs WT muestran 3 veces menor actividad de NAGLU que las iNs WT, mientras que las líneas celulares NAGLU3 y NAGLU4 presentan valores similares en ambos tipos celulares, aunque considerablemente inferiores a los de la línea WT. Una posible explicación es que, al tratarse de valores tan bajos, detectar diferencias significativas resulta mucho más difícil.

Sería interesante disponer de iPSCs y iNs derivadas de pacientes en las que medir la actividad de NAGLU y así poder compararla con la de los clones generados, tal como se pudo hacer con las iPSCs del artículo 2. Esta información ayudaría a entender si los niveles de actividad obtenidos para ambas líneas editadas están dentro de los niveles adecuados. Si se compara la actividad de las líneas mutadas iPSCs NAGLU3 y NAGLU4 con la de las iPSCs WT, se ve que ha habido una reducción cercana al 80%, la misma que se encuentra entre las iPSCs generadas en el artículo 2. Además, si se compara la actividad de las mismas líneas diferenciadas a iNs, la reducción en comparación a las iNs WT es cercana al 95%. Con estos datos, se puede asumir que ambas líneas generadas mediante CRISPR/Cas9 representan valores similares de actividad a los que se podrían encontrar en otras

líneas con mutaciones en *NAGLU*, y que a primeras no parece haber diferencias entre distintas mutaciones, aunque se deberían comparar valores con iPSCs y iNs de pacientes.

Por otro lado, también se confirmó que ambas líneas de iPSCs habían mantenido su pluripotencia tras el proceso de edición génica, así como su capacidad de diferenciación espontánea a las tres capas embrionarias. Con ello, las líneas de iPSCs NAGLU3 y NAGLU4, junto con las iPSCs WT, establecen una nueva base sobre la cual generar nuevos modelos para el síndrome de Sanfilippo B. Pero, además, al haber derivado estas líneas a partir de las iPSCs WT anteriormente utilizadas (artículo 2), tanto NAGLU3 como NAGLU4 también son líneas isogénicas respecto a *HGSNAT1* y *HGSNAT2*. Es decir, se dispone de líneas isogénicas de iPSCs para generar modelos de Sanfilippo B y Sanfilippo C, además de una línea control, todas ellas capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares que puedan resultar interesantes en el estudio de estas enfermedades, como serían las neuronas y los astrocitos (Figura 34).

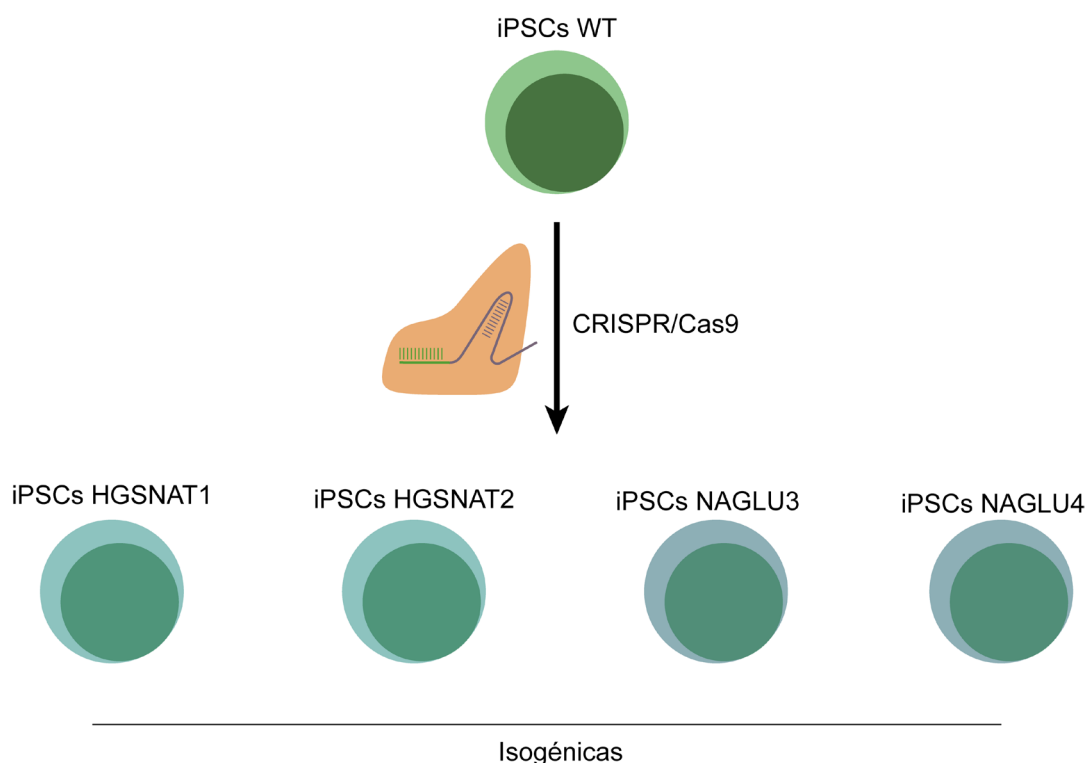


Figura 34. Esquema explicativo de las líneas isogénicas obtenidas. Dado que tanto las iPSCs con mutaciones en *HGSNAT* (*HGSNAT1* y *HGSNAT2*) como las que tienen mutaciones en *NAGLU* (*NAGLU3* y *NAGLU4*) han sido obtenidas de las iPSCs WT, las cinco líneas son isogénicas entre sí.

Este hecho presenta diferentes ventajas, como por ejemplo ver si existen diferencias sutiles en el fenotipo de cada una de las enfermedades, o en los mecanismos moleculares, ya que comparando líneas de pacientes no se detectan al asociarse a variaciones en el fondo genético. También se podría estudiar una misma estrategia terapéutica para dos enfermedades distintas en paralelo, con los mismos modelos celulares y el mismo fondo genético.

Como recapitulación de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se podría decir que se han generado nuevos modelos celulares de gran utilidad para el ensayo de potenciales aproximaciones terapéuticas, como es en este caso la SRT basada en el uso de siRNAs. En primer lugar, se comprobó la eficiencia de distintos siRNAs para reducir fenotipos típicos del síndrome de Sanfilippo en fibroblastos de pacientes (artículo 1). Dado estos buenos resultados se obtuvieron, mediante CRISPR/Cas9, líneas isogénicas de iPSCs con mutaciones en el gen *HGSNAT* (artículo 2), a partir de las cuales generar modelos celulares más relevantes para el síndrome de Sanfilippo C. Dado que esta enfermedad es principalmente neurodegenerativa, las iPSCs se diferenciaron a iNs e iAs (artículo 3) usando protocolos basados en la sobreexpresión de factores de transcripción, que son más rápidos y eficientes. Una vez comprobada la correcta diferenciación, se evaluó si las iNs recapitulaban fenotipos típicos del síndrome de Sanfilippo C, obteniendo resultados prometedores. Con ello, estas iNs se usaron para evaluar la eficiencia de la SRT basada en siRNAs ensayada previamente en fibroblastos. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron tan positivos en este tipo celular (artículo 3). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de evaluar potenciales estrategias terapéuticas en tipos celulares relevantes para cada enfermedad. Finalmente, aprovechando las estrategias usadas en los artículos previos, se decidió usar de nuevo la tecnología CRISPR/Cas9 para la obtención de iPSCs con mutaciones en el gen *NAGLU*, causantes del síndrome de Sanfilippo B, (artículo 4). Estas líneas isogénicas también son de gran utilidad para la generación de nuevos modelos celulares, como iNs o iAs, en los que evaluar potenciales aproximaciones terapéuticas como se hizo para el síndrome de Sanfilippo C.



CONCLUSIONES

- Se ha comprobado la eficiencia del uso de siRNAs contra los genes *EXTL2* y *EXTL3*, como terapia de reducción de sustrato sobre fibroblastos de pacientes de Sanfilippo C.

- Los siRNAs reducen tanto la expresión del mRNA de los genes correspondientes como la síntesis y almacenamiento de glicosaminoglicanos, siendo el siRNA-4899 contra el gen *EXTL2* el más eficiente.

- Se han generado mediante CRISPR/Cas9 dos líneas isogénicas de iPSCs mutantes para el gen *HGSNAT*, partiendo de iPSCs derivadas de fibroblastos de un donante sano.

- Las dos líneas de iPSCs mutantes para *HGSNAT*, así como la línea de iPSCs derivada de un donante sano y otra derivada de un paciente con síndrome de Sanfilippo C, han sido diferenciadas a neuronas y astrocitos inducidos mediante protocolos basados en la sobreexpresión de factores de transcripción.

- Las neuronas inducidas generadas muestran una tendencia al acúmulo de heparán sulfato, así como a un aumento en la carga lisosomal, recapitulando así fenotipos típicos del síndrome de Sanfilippo.

- Se ha comprobado la eficiencia del siRNA-4899 en la inhibición de la expresión del mRNA de *EXTL2* en neuronas y astrocitos inducidos.

- Tras tres días de tratamiento con el siRNA-4899, no se detectó reducción del acúmulo de heparán sulfato en neuronas inducidas.

- Mediante CRISPR/Cas9 se han generado dos líneas isogénicas de iPSCs mutantes para el gen *NAGLU*, partiendo de la misma línea de iPSCs que se usó para generar las líneas mutantes en el gen *HGSNAT*.



REFERENCIAS

A

- Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV & Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 353, aaf5573 (2016).
- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*. 9, 1911 (2018).
- Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, Llarena M & Couce ML. Sanfilippo syndrome: Overall review. *Pediatr Int*. 57, 331-338 (2015).
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A & Liu DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 576, 149-157 (2019).
- Aronovich EL, Johnston JM, Wang P, Giger U & Whitley CB. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type IIIB in emu (*Dromaius novaehollandiae*): an avian model of Sanfilippo syndrome type B. *Genomics*. 74, 299-305 (2001).

B

- Bajaj L, Lofti P, Pal R, di Ronza A, Sharma J & Sardiello M. Lysosome biogenesis in health and disease. *J. Neurochem*. 148, 573-589 (2019).
- Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, Caruelle JP, Martelly I & Papy-García D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*. 13, 647-653 (2003).
- Bassett AR. Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models. *Mamm Genome*. 28, 348-364 (2017).
- Ben Jehuda R, Shemer Y & Binah O. Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Rev Rep*. 14, 323-336 (2018).
- Benjamin ER, Della Valle MC, Wu X, Katz E, Pruthi F, Bond S, Bronfin B, Williams H, Yu J, Bichet DG, Germain DP, Giugliani R, Hughes D, Schiffmann R, Wilcox WR, Desnick RJ, Kirk J, Barth J, Barlow C, Valenzano KJ, Castelli J & Lockhart DJ. The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. *Genet Med*. 19, 430-438 (2017).
- Berger-Plantinga EG, Vanneste JA, Groener JE & van Schooneveld MJ. Adult-onset dementia and retinitis pigmentosa due to mucopolysaccharidosis III-C in two sisters. *J Neurol*. 251, 479-481 (2004).
- Biffi A. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Storage Disease: Current and New Indications. *Mol Ther*. 25, 1155-1162 (2017).
- Birrane G, Dassier AL, Romashko A, Lundberg D, Holmes K, Cottle T, Norton AW, Zhang B, Concino MF & Meiyappan M. Structural characterization of the α -N-acetylglucosamini-

- dase, a key enzyme in the pathogenesis of Sanfilippo syndrome B. *J Struct Biol.* 205, 65-71 (2019).
- Bishop JR, Schuksz M & Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 446, 1030-1037 (2007).
- Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Miller RJ & Kessler JA. The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 29, 802-811 (2011).
- Boado RJ, Lu JZ, Hui EK & Pardridge WM. Insulin receptor antibody-sulfamidase fusion protein penetrates the primate blood-brain barrier and reduces glycosaminoglycans in Sanfilippo type A cells. *Mol Pharm.* 11, 2928-2934 (2014).
- Boelens JJ, Aldenhoven M, Purtill D, Ruggeri A, Defor T, Wynn R, Wraith E, Cavazzana-Calvo M, Rovelli A, Fischer A, Tolar J, Prasad VK, Escolar M, Gluckman E, O'Meara A, Orchard PJ, Veys P, Eapen M, Kurtzberg J & Rocha V; Eurocord; Inborn Errors Working Party of European Blood and Marrow Transplant group; Duke University Blood and Marrow Transplantation Program; Centre for International Blood and Marrow Research. Outcomes of transplantation using various hematopoietic cell sources in children with Hurler syndrome after myeloablative conditioning. *Blood.* 121, 3981-3987 (2013).
- Bonam SR, Wang F & Muller S. Lysosomes as a therapeutic target. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 923-948 (2019).
- Borger DK, McMahon B, Roshan Lal T, Serra-Vinardell J, Aflaki E & Sidransky E. Induced pluripotent stem cell models of lysosomal storage disorders. *Dis Model Mech.* 10, 691-704 (2017).
- Boustany RMN. Lysosomal Storage diseases – the horizon expands. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 583-598 (2013).
- Braulke T & Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 605–614 (2009).
- Bruyère J, Roy E, Ausseil J, Lemonnier T, Teyre G, Bohl D, Etienne-Manneville S, Lortat-Jacob H, Heard JM & Vitry S. Heparan sulfate saccharides modify focal adhesions: implication in mucopolysaccharidosis neuropathophysiology. *J Mol Biol.* 427, 775-791 (2015).
- Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, Probst AJ, Anantharaman K, Thomas BC, Doudna JA & Banfield JF. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature.* 542, 237-241 (2017).
- Busse M, Feta A, Presto J, Wilén M, Grønning M, Kjellén L & Kusche-Gullberg M. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J Biol Chem.* 282, 32802-32810 (2007).
- Busse-Wicher M, Wicher KB & Kusche-Gullberg M. The exostosin family: proteins with many functions. *Matrix Biol.* 35, 25-33 (2014).

C

- Canals I, Elalaoui SC, Pineda M, Delgadillo V, Szlago M, Jaouad IC, Sefiani A, Chabás A, Coll MJ, Grinberg D & Vilageliu L. Molecular analysis of Sanfilippo syndrome type C in Spain: seven novel HGSNAT mutations and characterization of the mutant alleles. *Clin Genet.* 80, 367-374 (2011).
- Canals I, Ginisty A, Quist E, Timmerman R, Fritze J, Miskinyte G, Monni E, Hansen MG, Hidalgo I, Bryder D, Bengzon J & Ahlenius H. Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Methods.* 15, 693-696 (2018).
- Canals I, Soriano J, Orlandi JG, Torrent R, Richaud-Patin Y, Jiménez-Delgado S, Merlin S, Follenzi A, Consiglio A, Vilageliu L, Grinberg D & Raya A. Activity and High-Order Effective Connectivity Alterations in Sanfilippo C Patient-Specific Neuronal Networks. *Stem Cell Reports.* 5, 546-557 (2015).
- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics.* 188, 773-782 (2011).
- Casini A, Olivieri M, Petris G, Montagna C, Reginato G, Maule G, Lorenzin F, Prandi D, Romanel A, Demichelis F, Inga A & Cereseto A. A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat Biotechnol.* 36, 265-271 (2018).
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M & Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol.* 27, 275-280 (2009).
- Clayton NP, Nelson CA, Weeden T, Taylor KM, Moreland RJ, Scheule RK, Phillips L, Leger AJ, Cheng SH & Wentworth BM. Antisense Oligonucleotide-mediated Suppression of Muscle Glycogen Synthase 1 Synthesis as an Approach for Substrate Reduction Therapy of Pompe Disease. *Mol Ther Nucleic Acids.* 3, e206 (2014).
- Cleary M, Muschol N, Couce M, Harmatz P, Lee J, Lin SP, Okur I, Ezgu F, Peters H, Villarreal M, Shaywitz A, Cahan H, Grover A, Melton A, Smith L, Maricich S & Lopez M. ICV-administered traletsinidase alfa (BMN 250 NAGLU-IGF2) is well-tolerated and reduces heparan sulfate accumulation in the CNS of subjects with Sanfilippo syndrome type B (MPS IIIB). *Mol Genet Metab.* 126, S40 (2019).
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA & Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339, 819-823 (2013).
- Cooper O, Hargus G, Deleidi M, Blak A, Osborn T, Marlow E, Lee K, Levy A, Perez-Torres E, Yow A & Isacson O. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Mol Cell Neurosci.* 45, 258-266 (2010).
- Cox T. Innovative treatments for Lysosomal Diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 29, 275-311 (2015).

- Coutinho MF, Lacerda L, Prata MJ, Ribeiro H, Lopes L, Ferreira C & Alves S. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis IIIC: two novel mutations in the HGSNAT gene. *Clin Genet.* 74, 194-195 (2008).
- Coutinho MF, Santos JI & Alves S. Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Int J Mol Sci.* 17, E1065 (2016a).
- Coutinho MF, Santos JI, Matos L & Alves S. Genetic Substrate Reduction Therapy: A Promising Approach for Lysosomal Storage Disorders. *Diseases.* 4, E33 (2016b).

D

- D'Astolfo DS, Pagliero RJ, Pras A, Karthaus WR, Clevers H, Prasad V, Lebbink RJ, Rehmann H & Geijsen N. Efficient intracellular delivery of native proteins. *Cell.* 161, 674-690 (2015).
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R & Appelmans F. Tissue fractionation studies 6 Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-17 (1955).
- De Pasquale V & Pavone LM. Heparan sulfate proteoglycans: The sweet side of development turns sour in mucopolysaccharidoses. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1865, 165539 (2019).
- De Ruijter J, Valstar MJ, Narajczyk M, Wegrzyn G, Kulik W, Ijlst L, Wagemans T, van der Wal WM & Wijburg FA. Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Ann Neurol.* 71, 110-20 (2012).
- De Ruijter J, Valstar MJ & Wijburg FA. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo Syndrome): emerging treatment strategies. *Curr Pharm Biotechnol.* 12, 923-930 (2011).
- Delgadillo V, O'Callaghan Mdel M, Artuch R, Montero R & Pineda M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis.* 34, 1039-1044 (2011).
- DeWitt MA, Corn JE & Carroll D. Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. *Methods.* 121-122, 9-15 (2017).
- Diaz-Font A, Chabás A, Grinberg D & Vilageliu L. RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: A preliminary study towards a therapeutic strategy for Gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases. *Blood Cells Mol Dis.* 37, 197-203 (2006).
- Dire DJ & Wilkinson JA. Acute exposure to rhodamine B. *J Toxicol Clin Toxicol.* 25, 603-7 (1987).
- Doudna JA & Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 346, 1258096 (2014).
- Duncan FJ, Naughton BJ, Zaraspe K, Murrey DA, Meadows AS, Clark KR, Newsom DE, White P, Fu H & McCarty DM. Broad functional correction of molecular impairments by

systemic delivery of scAAVrh74-hSGSH gene delivery in MPS IIIA mice. *Mol Ther.* 23, 638-647 (2015).

Dziedzic D, Wegrzyn G & Jakóbkiewicz-Banecka J. Impairment of glycosaminoglycan synthesis in mucopolysaccharidosis type IIIA cells by using siRNA: a potential therapeutic approach for Sanfilippo disease. *Eur J Hum Genet.* 18, 200-205 (2010).

E

Ellinwood NM, Wang P, Skeen T, Sharp NJ, Cesta M, Decker S, Edwards NJ, Bublot I, Thompson JN, Bush W, Hardam E, Haskins ME & Giger U. A model of mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo syndrome type IIIB): N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase deficiency in Schipperke dogs. *J Inherit Metab Dis.* 26, 489-504 (2003).

Ellison SM, Liao A, Wood S, Taylor J, Youshani AS, Rowston S, Parker H, Armant M, Biffi A, Chan L, Farzaneh F, Wynn R, Jones SA, Heal P, Gaspar HB & Bigger BW. Pre-clinical Safety and Efficacy of Lentiviral Vector-Mediated Ex Vivo Stem Cell Gene Therapy for the Treatment of Mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 13, 399-413 (2019).

Emdad L, D'Souza SL, Kothari HP, Qadeer ZA & Germano IM. Efficient differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells into functional astrocytes. *Stem Cells Dev.* 21, 404-410 (2012).

Esko JD, Kimata K & Lindahl U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. Editors: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW & Etzler ME. Essentials of Glycobiology Chapter 16. 2nd edition. *Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2009).

F

Fan X, Tkachyova I, Sinha A, Rigat B & Mahuran D. Characterization of the biosynthesis, processing and kinetic mechanism of action of the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC. *PLoS One.* 6, e24951 (2011).

Fan X, Zhang H, Zhang S, Bagshaw RD, Tropak MB, Callahan JW & Mahuran DJ. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am J Hum Genet.* 79, 738-744 (2006).

Fasano CA, Chambers SM, Lee G, Tomishima MJ & Studer L. Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 6, 336-347 (2010).

Fedele AO. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. *Appl Clin Genet.* 8, 269-281 (2015).

Fedele AO, Filocamo M, Di Rocco M, Sersale G, Lübke T, di Natale P, Cosma MP & Ballabio A. Mutational analysis of the HGSNAT gene in Italian patients with mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Hum Mutat.* 28, 523 (2007).

- Fedele AO, Isenmann S, Kamei M, Snel MF, Trim PJ, Proud CG & Hopwood JJ. Lysosomal N-acetyltransferase interacts with ALIX and is detected in extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1865, 1451-1464 (2018).
- Feldhammer M, Durand S & Pshezhetsky AV. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PLoS One.* 4, e7434 (2009).
- Fenzl CR, Teramoto K & Moshirfar M. Ocular manifestations and management recommendations of lysosomal storage disorders I: mucopolysaccharidoses. *Clin Ophthalmol.* 9, 1633-1644 (2015).
- Ficko-Blean E, Stubbs KA, Nemirovsky O, Vocadlo DJ & Boraston AB. Structural and mechanistic insight into the basis of mucopolysaccharidosis IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 6560-6565 (2008).
- Fragaki K, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Gire C, Mengual R, Bonesso L, Bénêteau M, Ricci JE, Desquirit-Dumas V, Procaccio V, Rötig A & Paquis-Flucklinger V. Refractory epilepsy and mitochondrial dysfunction due to GM3 synthase deficiency. *European Journal of Human Genetics.* 21, 528–534 (2013).
- Fu H & McCarty DM. Crossing the blood–brain-barrier with viral vectors. *Curr. Opin. Virol.* 21, 87–92 (2016).

G

- Gaffke L, Pierzynowska K, Piotrowska E & Węgrzyn G. How close are we to therapies for Sanfilippo disease? *Metab Brain Dis.* 33, 1-10 (2018).
- Gaffke L, Pierzynowska K, Podlacha M, Brokowska J & Węgrzyn G. Changes in cellular processes occurring in mucopolysaccharidoses as underestimated pathomechanisms of these diseases. *Cell Biol Int.* (2019).
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P & Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, E2579-86 (2012).
- Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, Bichet DG, Giugliani R, Wilcox WR, Feliciani C, Shankar SP, Ezgu F, Amartino H, Bratkovic D, Feldt-Rasmussen U, Nedd K, Sharaf El Din U, Lourenco CM, Banikazemi M, Charrow J, Dasouki M, Finegold D, Giraldo P, Goker-Alpan O, Longo N, Scott CR, Torra R, Tuffaha A, Jovanovic A, Waldek S, Packman S, Ludington E, Viereck C, Kirk J, Yu J, Benjamin ER, Johnson F, Lockhart DJ, Skuban N, Castelli J, Barth J, Barlow C & Schiffmann R. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Miglustat. *N Engl J Med.* 375, 545-55 (2016).
- Griffin LS & Gloster TM. The Enzymatic Degradation of Heparan Sulfate. *Protein Pept Lett.* 24, 710-722 (2017).
- Guffon N, Bin-Dorel S, Decullier E, Paillet C, Guitton J & Fouilhoux A. Evaluation of miglustat treatment in patients with type III mucopolysaccharidosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr.* 159, 838-844 (2011).

Gupta K, Patani R, Baxter P, Serio A, Story D, Tsujita T, Hayes JD, Pedersen RA, Hardingham GE & Chandran S. Human embryonic stem cell derived astrocytes mediate non-cell-autonomous neuroprotection through endogenous and drug-induced mechanisms. *Cell Death Differ.* 19, 779-787 (2012).

H

Han X, Chen M, Wang F, Windrem M, Wang S, Shanz S, Xu Q, Oberheim NA, Bekar L, Betstadt S, Silva AJ, Takano T, Goldman SA & Nedergaard M. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell.* 12, 342-53 (2013).

Hartung T. Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism Relat Disord.* 14, S81-S83 (2008).

Ho AL, Keshavarzi S & Levy ML. Exploitation of genetically modified neural stem cells for neurological disease. *Adv Exp Med Biol.* 671, 74-92 (2010).

Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barrett AJ, Byrom N, Chambers D, Henry K, James DC, Lucas CF, Rogers TR, Benson PF, Tansley LR, Patrick AD, Mossman J & Young EP. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 2, 709-712 (1981).

Hockemeyer D & Jaenisch R. Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Cell Stem Cell.* 18, 573-86 (2016).

Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S & Cartier N. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum. Gene Ther.* 27, 478-496 (2016).

Holley RJ, Ellison SM, Fil D, O'Leary C, McDermott J, Senthivel N, Langford-Smith AWW, Wilkinson FL, D'Souza Z, Parker H, Liao A, Rowlston S, Gleitz HFE, Kan SH, Dickson PI & Bigger BW. Macrophage enzyme and reduced inflammation drive brain correction of mucopolysaccharidosis IIIB by stem cell gene therapy. *Brain.* 141, 99-116 (2018).

Hřebíček M, Mrázová L, Seyrantepe V, Durand S, Roslin NM, Nosková L, Hartmannová H, Ivánek R, Cízková A, Poupetová H, Sikora J, Urinovská J, Stranecký V, Zeman J, Lepage P, Roquis D, Verner A, Ausseil J, Beesley CE, Maire I, Poorthuis BJ, van de Kamp J, van Diggelen OP, Wevers RA, Hudson TJ, Fujiwara TM, Majewski J, Morgan K, Knoch S & Pshezhetsky AV. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Am J Hum Genet.* 79, 807-819 (2006).

Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z & Liu DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature.* 556, 57-63 (2018).

Huang W, Xu M, Li R, Baskfield A, Kouznetsova J, Beers J, Zou J, Liu C & Zheng W. An induced pluripotent stem cell line (TRNDi006-A) from a MPS IIIB patient carrying homozygous mutation of p.Glu153Lys in the NAGLU gene. *Stem Cell Res.* 37, 101427 (2019).

I

Ishay Y, Zimran A, Szer J, Dinur T, Ilan Y & Arkadir D. Combined beta-glucosylceramide and ambroxol hydrochloride in patients with Gaucher related Parkinson disease: From clinical observations to drug development. *Blood Cells Mol Dis.* 68, 117-120 (2018).

J

Jakóbkiewicz-Banecka J, Piotrowska E, Narajczyk M, Barańska S & Wegrzyn G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *J Biomed Sci.* 16, 26 (2009).

Jeyakumar M, Lee JP, Sibson NR, Lowe JP, Stuckey DJ, Tester K, Fu G, Newlin R, Smith DA, Snyder EY & Platt FM. Neural stem cell transplantation benefits a monogenic neurometabolic disorder during the symptomatic phase of disease. *Stem Cells.* 27, 2362-2370 (2009).

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA & Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337, 816-821.

Jones SA, Breen C, Heap F, Rust S, de Ruijter J, Tump E, Marchal JP, Pan L, Qiu Y, Chung JK, Nair N, Haslett PA, Barbier AJ & Wijburg FA. A phase 1/2 study of intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol Genet Metab.* 118, 198-205 (2016).

K

Kaidonis X, Liaw WC, Roberts AD, Ly M, Anson D & Byers S. Gene silencing of EXTL2 and EXTL3 as a substrate deprivation therapy for heparan sulphate storing mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet.* 18, 194-9 (2010).

Kan SH, Aoyagi-Scharber M, Le SQ, Vincelette J, Ohmi K, Bullens S, Wendt DJ, Christianson TM, Tiger PM, Brown JR, Lawrence R, Yip BK, Holtzinger J, Bagri A, Crippen-Harmon D, Vondrak KN, Chen Z, Hague CM, Woloszynek JC, Cheung DS, Webster KA, Adintori EG, Lo MJ, Wong W, Fitzpatrick PA, LeBowitz JH, Crawford BE, Bunting S, Dickson PI & Neufeld EF. Delivery of an enzyme-IGFII fusion protein to the mouse brain is therapeutic for mucopolysaccharidosis type IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 14870-14875 (2014).

Kavyasudha C, Macrin D, ArulJothi KN, Joseph JP, Harishankar MK & Devi A. Clinical Applications of Induced Pluripotent Stem Cells - Stato Attuale. *Adv Exp Med Biol.* 1079, 127-149 (2018).

- Khan SA, Peracha H, Ballhausen D, Wiesbauer A, Rohrbach M, Gautschi M, Mason RW, Giugliani R, Suzuki Y, Oii KE, Oii T & Tomatsu S. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab.* 121, 227-240 (2017).
- Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U & Sugahara K. Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 7176-7181 (2001).
- Kim KH, Dodsworth C, Paras A & Burton BK. High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. *Mol Genet Metab.* 109, 382-5 (2013).
- Kingma SDK, Bodamer OA & Wijburg FA. Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 29, 145-157 (2015).
- Kishnani PS, Goldenberg PC, DeArme SL, Heller J, Benjamin D, Young S, Bali D, Smith SA, Li JS, Mandel H, Koeberl D, Rosenberg A & Chen YT. Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab.* 99, 26-33 (2010).
- Kitagawa H, Shimakawa H & Sugahara K. The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 274, 13933-13937 (1999).
- Klein U, Kresse H & von Figura K. Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 5185-5189 (1978).
- Komor AC, Badran AH & Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell.* 168, 20-36 (2017).
- Köwitsch A, Zhou G & Groth T. Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J Tissue Eng Regen Med.* 12, e23-e41 (2018).
- Krencik R, Weick JP, Liu Y, Zhang ZJ & Zhang SC. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 29, 528-534 (2011).
- Krencik R & Zhang SC. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 6, 1710-1717 (2011).
- Kresse H & Neufeld EF. The Sanfilippo A corrective factor. Purification and mode of action. *J Biol Chem.* 247, 2164-2170 (1972).
- Kresse H, Paschke E, von Figura K, Gilberg W & Fuchs W. Sanfilippo disease type D: deficiency of N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase required for heparan sulfate degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 6822-6826 (1980).

- Kreuger J & Kjellén L. Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J Histochem Cytochem.* 60, 898-907 (2012).
- Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, Buch A, Yang L, Beal MF, Surmeier DJ, Kordower JH, Tabar V & Studer L. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature.* 480, 547-551 (2011).
- L**
- Lachmann RH, te Vrugte D, Lloyd-Evans E, Reinkensmeier G, Sillence DJ, Fernandez-Guillen L, Dwek RA, Butters TD, Cox TM & Platt FM. Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiol Dis.* 16, 654-658 (2004).
- Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Holley RJ, Sergijenko A, Howe SJ, Bennett WR, Jones SA, Wraith J, Merry CL, Wynn RF & Bigger BW. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther.* 20, 1610-21 (2012).
- Lavery C, Hendriksz CJ & Jones SA. Mortality in patients with Sanfilippo síndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 12, 168 (2017).
- Lawrence R, Brown JR, Al-Mafraji K, Lamanna WC, Beitel JR, Boons GJ, Esko JD & Crawford BE. Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Nat Chem Biol.* 8, 197-204 (2012).
- Lawrence RE, Cho KF, Rappold R, Thrun A, Tofaute M, Kim DJ, Moldavski O, Hurley JH & Zoncu R. A nutrient-induced affinity switch controls mTORC1 activation by its Rag GTPase–Regulator lysosomal scaffold. *Nat. Cell Biol.* 20, 1052–1063 (2018).
- Lawrence R & Zoncu R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat. Cell Biol.* 21, 133-142 (2019).
- Lemonnier T, Blanchard S, Toli D, Roy E, Bigou S, Froissart R, Rouvet I, Vitry S, Heard JM & Bohl D. Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 20, 3653-3666 (2011).
- Li HH, Yu WH, Rozengurt N, Zhao HZ, Lyons KM, Anagnostaras S, Fanselow MS, Suzuki K, Vanier MT & Neufeld EF. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 14505-14510 (1999).
- Li J, Ryan SK, Deboer E, Cook K, Fitzgerald S, Lachman HM, Wallace DC, Goldberg EM & Anderson SA. Mitochondrial deficits in human iPSC-derived neurons from patients with 22q11.2 deletion syndrome and schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 9, 302 (2019a).
- Li JP & Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *Int Rev Cell Mol Biol.* 325, 215-73 (2016).

- Li Z, Wu Z, Maekawa T, Cheung WD, Webber K, Zhi L, O'Brian K, Howie B, Zhang C, Kondragunta B, Marshall T & Gerner F. Analytical Technology Used in the Latest Development of Gene Therapy Candidates. *Cell & Gene Therapy Insights*. 5, 537-547 (2019b).
- Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE & Matzuk MM. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol*. 224, 299-311 (2000).
- Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U & Lidholt K. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 273, 26265-26268 (1998).
- Liour SS, Jones MZ, Suzuki M, Bieberich E & Yu RK. Metabolic studies of glycosphingolipid accumulation in mucopolysaccharidosis IIID. *Mol Genet Metab*. 72, 239-247 (2001).
- Liu J, Gao C, Chen W, Ma W, Li X, Shi Y, Zhang H, Zhang L, Long Y, Xu H, Guo X, Deng S, Yan X, Yu D, Pan G, Chen Y, Lai L, Liao W & Li Z. CRISPR/Cas9 facilitates investigation of neural circuit disease using human iPSCs: mechanism of epilepsy caused by an SCN1A loss-of-function mutation. *Transl Psychiatry*. 6, e703 (2016).
- Loayza-Puch F, Rooijers K, Buil LC, Zijlstra J, Oude Vrielink JF, Lopes R, Ugalde AP, van Breugel P, Hofland I, Wesseling J, van Tellingen O, Bex A & Agami R. Tumour-specific proline vulnerability uncovered by differential ribosome codon reading. *Nature*. 530, 490-494 (2016).
- Lundin A, Delsing L, Clausen M, Ricchiuto P, Sanchez J, Sabirsh A, Ding M, Synnergren J, Zetterberg H, Brolén G, Hicks R, Herland A & Falk A. Human iPS-Derived Astroglia from a Stable Neural Precursor State Show Improved Functionality Compared with Conventional Astrocytic Models. *Stem Cell Reports*. 10, 1030-1045 (2018).

M

- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE & Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339, 823-826 (2013).
- Malinowska M, Wilkinson FL, Bennett W, Langford-Smith KJ, O'Leary HA, Jakobkiewicz-Bancka J, Wynn R, Wraith JE, Wegrzyn G & Bigger BW. Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. *Mol Genet Metab*. 98, 235-42 (2009).
- Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Langford-Smith A, Brown JR, Crawford BE, Vanier MT, Gryniewicz G, Wynn RF, Wraith JE, Wegrzyn G & Bigger BW. Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One*. 5, e14192 (2010).
- Marcó S, Pujol A, Roca C, Molas S, Ribera A, Garcia M, Molas M, Villacampa P, Melia CS, Sánchez V, Sánchez X, Bertolin J, Ruberte J, Haurigot V & Bosch F. Progressive neurologic and somatic disease in a novel mouse model of human mucopolysaccharidosis type IIIC. *Dis Model Mech*. 9, 999-1013 (2016).

- Maroof AM, Keros S, Tyson JA, Ying SW, Ganat YM, Merkle FT, Liu B, Goulburn A, Stanley EG, Elefanty AG, Widmer HR, Eggan K, Goldstein PA, Anderson SA & Studer L. Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 12, 559-572 (2013).
- Martins C, Hůlková H, Dridi L, Dormoy-Raclet V, Grigoryeva L, Choi Y, Langford-Smith A, Wilkinson FL, Ohmi K, DiCristo G, Hamel E, Ausseil J, Cheillan D, Moreau A, Svobodová E, Hájková Z, Tesařová M, Hansíková H, Bigger BW, Hřebíček M & Pshezhetsky AV. Neuroinflammation, mitochondrial defects and neurodegeneration in mucopolysaccharidosis III type C mouse model. *Brain*. 138, 336-355 (2015).
- Mavuluri J, Beesetti S, Surabhi R, Kremerskothen J, Venkatraman G & Rayala SK. Phosphorylation-Dependent Regulation of the DNA Damage Response of Adaptor Protein KIBRA in Cancer Cells. *Mol Cell Biol*. 36, 1354-1365 (2016).
- McClore G & Wood MJ. An overview of the clinical application of antisense oligonucleotides for RNA-targeting therapies. *Curr Opin Pharmacol*. 24, 52-58 (2015).
- McCormick C, Duncan G, Goutsos KT & Tufaro F. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 668-673 (2000).
- Mellman I. Organelles observed: lysosomes. *Science*. 244, 853-4 (1989).
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J & Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 60, 174-182 (2005).
- Moog U, van Mierlo I, van Schrojenstein Lantman-de Valk HM, Spaapen L, Maaskant MA & Curfs LM. Is Sanfilippo type B in your mind when you see adults with mental retardation and behavioral problems? *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 145C, 293-301 (2007).
- Morla S. Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 20, E1963 (2019).
- Moskot M, Montefusco S, Jakóbkiewicz-Banecka J, Mozolewski P, Węgrzyn A, Di Bernardo D, Węgrzyn G, Medina DL, Ballabio A & Gabig-Cimińska M. The phytoestrogen genistein modulates lysosomal metabolism and transcription factor EB (TFEB) activation. *J Biol Chem*. 289, 17054-69 (2014).

N

- Nadanaka S, Kagiya S & Kitagawa H. Roles of EXTL2, a member of the EXT family of tumour suppressors, in liver injury and regeneration processes. *Biochem J*. 454, 133-145 (2013a).
- Nadanaka S, Zhou S, Kagiya S, Shoji N, Sugahara K, Sugihara K, Asano M & Kitagawa H. EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminogly-

can biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* 288, 9321-9333 (2013b).

Narita A, Shirai K, Itamura S, Matsuda A, Ishihara A, Matsushita K, Fukuda C, Kubota N, Takayama R, Shigematsu H, Hayashi A, Kumada T, Yuge K, Watanabe Y, Kosugi S, Nishida H, Kimura Y, Endo Y, Higaki K, Nanba E, Nishimura Y, Tamasaki A, Togawa M, Saito Y, Maegaki Y, Ohno K & Suzuki Y. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Ann Clin Transl Neurol.* 3, 200-215 (2016).

Naughton BJ, Duncan FJ, Murrey D, Ware T, Meadows A, McCarty DM & Fu H. Amyloidosis, synucleinopathy, and prion encephalopathy in a neuropathic lysosomal storage disease: the CNS-biomarker potential of peripheral blood. *PLoS One.* 8, e80142 (2013).

Neufeld EF & Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill. 3, 3421–3452 (2001).

Nicholas CR, Chen J, Tang Y, Southwell DG, Chalmers N, Vogt D, Arnold CM, Chen YJ, Stanley EG, Elefanty AG, Sasai Y, Alvarez-Buylla A, Rubenstein JL & Kriegstein AR. Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell Stem Cell.* 12, 573-586 (2013).

Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W & Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* 156, 836-843 (2014).

O

O'Brien JS. Sanfilippo syndrome: profound deficiency of alpha-acetylglucosaminidase activity in organs and skin fibroblasts from type-B patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69, 1720-1722 (1972).

Oguma T, Tomatsu S, Montano AM & Okazaki O. Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 368, 79-86 (2007).

Oh Y & Jang J. Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells by Transcription Factors. *Mol Cells.* 42, 200-209 (2019).

Okada M, Nadanaka S, Shoji N, Tamura J & Kitagawa H. Biosynthesis of heparan sulfate in EXT1-deficient cells. *Biochem J.* 428, 463-471 (2010).

Ortolano S, Viéitez I, Navarro C & Spuch C. Treatment of lysosomal storage diseases: recent patents and future strategies. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 8, 9-25 (2014).

Oud MM, Tuijnenburg P, Hempel M, van Vlies N, Ren Z, Ferdinandusse S, Jansen MH, Santer R, Johannsen J, Bacchelli C, Alders M, Li R, Davies R, Dupuis L, Cale CM, Wanders RJA, Pals ST, Ocaña L, James C, Müller I, Lehmberg K, Strom T, Engels H,

Williams HJ, Beales P, Roepman R, Dias P, Brunner HG, Cobben JM, Hall C, Hartley T, Le Quesne Stabej P, Mendoza-Londono R, Davies EG, de Sousa SB, Lessel D, Arts HH & Kuijpers TW. Mutations in EXTL3 Cause Neuro-immuno-skeletal Dysplasia Syndrome. *Am J Hum Genet.* 100, 281-296 (2017).

Ouesleti S, Coutinho MF, Ribeiro I, Miled A, Mosbahi DS & Alves S. Update of the spectrum of mucopolysaccharidoses type III in Tunisia: identification of three novel mutations and in silico structural analysis of the missense mutations. *World J Pediatr.* 13, 374-380 (2017).

Oyarzún JE, Lagos J, Vázquez MC, Valls C, De la Fuente C, Yuseff MI, Alvarez AR & Zanolungo S. Lysosome motility and distribution: Relevance in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1865, 1076-1087 (2019).

P

Pacifici M. Hereditary Multiple Exostoses: New Insights into Pathogenesis, Clinical Complications, and Potential Treatments. *Curr Osteoporos Rep.* 15, 142-152 (2017).

Parenti G, Andria G & Ballabio A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu. Rev. Med.* 66, 471-486 (2015a).

Parenti G, Andria G & Valenzano K. Pharmacological chaperone therapy: Preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Mol Ther.* 23, 1138–1148 (2015b).

Pedersen LC, Dong J, Taniguchi F, Kitagawa H, Krahn JM, Pedersen LG, Sugahara K & Negishi M. Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem.* 278, 14420-14428 (2003).

Perera RM & Zoncu R. The lysosome as a regulatory hub. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 223–253 (2016).

Pickar-Oliver A & Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20, 490-507 (2019).

Pineda M, Walterfang M & Patterson MC. Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients: a review. *Orphanet J Rare Dis.* 13, 140 (2018).

Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Barańska S, Tylki-Szymańska A, Czartoryska B, Wegrzyn A & Wegrzyn G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet.* 14, 846-52 (2006).

Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Maryniak A, Tylki-Szymanska A, Puk E, Liberek A, Wegrzyn A, Czartoryska B, Slominska-Wojewodzka M & Wegrzyn G. Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. *Med Sci Monit.* 17, CR196-202 (2011).

- Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymanska A, Liberek A, Maryniak A, Malinowska M, Czaratoryska B, Puk E, Kloska A, Liberek T, Baranska S, Wegrzyn A & Wegrzyn G. Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Curr Ther Res Clin Exp.* 69, 166-79 (2008).
- Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 133-150 (2018).
- Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF & Tiffet CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 4, 27 (2018).
- Platt FM, Neises G, Dwek RA & Butters TD. Method of inhibiting glycolipid synthesis. Patent: US5525616 (1996).

R

- Radin NS. Treatment of Gaucher disease with an enzyme inhibitor. *Glycoconj J.* 13, 153-7 (1996).
- Raj K, Ellinwood NM & Giger U. An exonic insertion in the NAGLU gene causing Mucopolysaccharidosis IIIB in Schipperke dogs. *Sci Rep.* 10, 3170 (2020).
- Ramachandran PV & Ignacimuthu S. RNA interference - a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol.* 169, 1774-89 (2013).
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A & Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 19, 1134-1140 (2001).
- Roberts AL, Fletcher JM, Moore L & Byers S. Trans-generational exposure to low levels of rhodamine B does not adversely affect litter size or liver function in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab.* 101, 208-13 (2010).
- Roberts AL, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM & Byers S. Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol Genet Metab.* 92, 115-21 (2007).
- Roberts AL, Thomas BJ, Wilkinson AS, Fletcher JM & Byers S. Inhibition of glycosaminoglycan synthesis using rhodamine B in a mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Pediatr Res.* 60, 309-14 (2006).
- Robertson DA, Callen DF, Baker EG, Morris CP & Hopwood JJ. Chromosomal localization of the gene for human glucosamine-6-sulphatase to 12q14. *Hum Genet.* 79, 175-178 (1988).
- Roy E, Bruyère J, Flamant P, Bigou S, Ausseil J, Vitry S & Heard JM. GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease. *Hum Mol Genet.* 21, 1481-1495 (2012).
- Roybon L, Lamas NJ, Garcia AD, Yang EJ, Sattler R, Lewis VJ, Kim YA, Kachel CA, Rothstein JD, Przedborski S, Wichterle H & Henderson CE. Human stem cell-derived spinal

cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep.* 4, 1035-1048 (2013).

Ruijter GJ, Valstar MJ, van de Kamp JM, van der Helm RM, Durand S, van Diggelen OP, Wevers RA, Poorthuis BJ, Pshezhetsky AV & Wijburg FA. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol Genet Metab.* 93, 104-111 (2008).

Ruzo A, Marcó S, García M, Villacampa P, Ribera A, Ayuso E, Maggioni L, Mingozi F, Hau-rigot V & Bosch F. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther.* 23, 1237-1246 (2012).

S

Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S & Sabatini DM. Ragulator–Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 141, 290–303 (2010).

Santos R, Vadodaria KC, Jaeger BN, Mei A, Lefcochilos-Fogelquist S, Mendes APD, Erikson G, Shokhirev M, Randolph-Moore L, Fredlender C, Dave S, Oefner R, Fitzpatrick C, Pena M, Barron JJ, Ku M, Denli AM, Kerman BE, Charnay P, Kelsoe JR, Marchetto MC & Gage FH. Differentiation of Inflammation-Responsive Astrocytes from Glial Progenitors Generated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 8, 1757-1769 (2017).

Sardiello M, Palmieri M, Di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E & Ballabio A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* 325, 473– 477 (2009).

Sarrazin S, Lamanna WC & Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3, a004952 (2011).

Sawamoto K, Stapleton M, Alméciga-Díaz CJ, Espejo-Mojica AJ, Losada JC, Suarez DA & Tomatsu S. Therapeutic Options for Mucopolysaccharidoses: Current and Emerging Treatments. *Drugs.* 79, 1103-1134 (2019).

Saxton RA & Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell.* 169, 361–371 (2017).

Scott HS, Blanch L, Guo XH, Freeman C, Orsborn A, Baker E, Sutherland GR, Morris CP & Hopwood JJ. Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nat Genet.* 11, 465-467 (1995).

Senay C, Lind T, Muguruma K, Tone Y, Kitagawa H, Sugahara K, Lidholt K, Lindahl U & Kusche-Gullberg M. The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.* 1, 282-286 (2000).

- Sergijenko A, Langford-Smith A, Liao AY, Pickford CE, McDermott J, Nowinski G, Langford-Smith KJ, Merry CL, Jones SA, Wraith JE, Wynn RF, Wilkinson FL & Bigger BW. Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene therapy corrects a neuronopathic lysosomal disease. *Mol Ther*. 21, 1938-49 (2013).
- Serio A, Bilican B, Barmada SJ, Ando DM, Zhao C, Siller R, Burr K, Haghi G, Story D, Nishimura AL, Carrasco MA, Phatnani HP, Shum C, Wilmot I, Maniatis T, Shaw CE, Finkbeiner S & Chandran S. Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, 4697-4702 (2013).
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC & Ballabio A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*. 332, 1429-33 (2011).
- Settembre C, Fraldi A, Medina DL & Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 14, 283–296 (2013).
- Shao Y, Guan Y, Wang L, Qiu Z, Liu M, Chen Y, Wu L, Li Y, Ma X, Liu M & Li D. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc*. 9, 2493-2512 (2014).
- Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, Zhang X, Zhang P & Huang X. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*. 23, 720-723 (2013).
- Shihabuddin LS & Cheng SH. Neural stem cell transplantation as a therapeutic approach for treating lysosomal storage diseases. *Neurotherapeutics*. 8, 659-667 (2011).
- Shihabuddin LS, Numan S, Huff MR, Dodge JC, Clarke J, Macauley SL, Yang W, Taksir TV, Parsons G, Passini MA, Gage FH & Stewart GR. Intracerebral transplantation of adult mouse neural progenitor cells into the Niemann-Pick-A mouse leads to a marked decrease in lysosomal storage pathology. *J Neurosci*. 24, 10642-10651 (2004).
- Siddiqi F & Wolfe JH. Stem Cell Therapy for the Central Nervous System in Lysosomal Storage Diseases. *Hum Gene Ther*. 27, 749-757 (2016).
- Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P & Siksnys V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J*. 30, 1335-1342 (2011).
- Snyder EY, Taylor RM & Wolfe JH. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature*. 374, 367-370 (1995).
- Sohn YB. Innovative Therapeutic Approaches for Mucopolysaccharidosis III. *J Mucopolysacch Rare Dis*. 4, 37-41 (2018).
- Soldner F & Jaenisch R. Medicine. iPSC disease modeling. *Science*. 338, 1155-1156 (2012).
- Soldner F, Laganière J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S, Zhang L, Guschin D, Fong LK, Vu BJ, Meng X, Urnov FD,

Rebar EJ, Gregory PD, Zhang HS & Jaenisch R. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*. 146, 318-331 (2011).

Solomon M & Muro S. Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 118, 109-134 (2017).

Stanslowsky N, Reinhardt P, Glass H, Kalmbach N, Naujock M, Hensel N, Lübben V, Pal A, Venneri A, Lupo F, De Franceschi L, Claus P, Sternecker J, Storch A, Hermann A & Wegner F. Neuronal Dysfunction in iPSC-Derived Medium Spiny Neurons from Chorea-Acanthocytosis Patients Is Reversed by Src Kinase Inhibition and F-Actin Stabilization. *J Neurosci*. 36, 12027-12043 (2016).

Sternecker JL, Reinhardt P & Schöler HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet*. 15, 625-639 (2014).

Stickens D, Zak BM, Rougier N, Esko JD & Werb Z. Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. *Development*. 132, 5055-5068 (2005).

Sutherland LM, Hemsley KM & Hopwood JJ. Primary culture of neural cells isolated from the cerebellum of newborn and adult mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Cell Mol Neurobiol*. 28, 949-959 (2008).

T

Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Yamada S, Kaneiwa T, Mizumoto S, Ikeda T, Sugihara K, Asano M, Yoshikawa T, Yamauchi A, Shervani NJ, Uruno A, Kato I, Unno M, Sugahara K, Takasawa S, Okamoto H & Sugawara A. Important role of heparan sulfate in post-natal islet growth and insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 383, 113-118 (2009).

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 861-872 (2007).

Takahashi K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126, 663-676 (2006).

Tao Y & Zhang SC. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 19, 573-586 (2016).

Tardieu M, Zerah M, Gougeon ML, Ausseil J, de Bournonville S, Husson B, Zafeiriou D, Parenti G, Bourget P, Poirier B, Furlan V, Artaud C, Baugnon T, Roujeau T, Crystal RG, Meyer C, Deiva K & Heard JM. Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *Lancet Neurol*. 16, 712-720 (2017).

Tardieu M, Zerah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C, Vincent F, Hocquemiller M, Broissand C, Furlan V, Ballabio A, Fraldi A, Crystal RG, Baugnon T, Roujeau T, Heard JM & Danos O. Intracerebral administration of adeno-associated

viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum. Gene Ther.* 25, 506-516 (2014).

Tiscornia G, Vivas EL & Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med.* 17, 1570-1576 (2011).

Tordo J, O'Leary C, Antunes ASLM, Palomar N, Aldrin-Kirk P, Basche M, Bennett A, D'Souza Z, Gleitz H, Godwin A, Holley RJ, Parker H, Liao AY, Rouse P, Youshani AS, Dridi L, Martins C, Levade T, Stacey KB, Davis DM, Dyer A, Clément N, Björklund T, Ali RR, Agbandje-McKenna M, Rahim AA, Pshezhetsky A, Waddington SN, Linden RM, Bigger BW & Henckaerts E. A novel adeno-associated virus capsid with enhanced neurotropism corrects a lysosomal transmembrane enzyme deficiency. *Brain.* 141, 2014-2031 (2018).

Torres R, Martin MC, Garcia A, Cigudosa JC, Ramirez JC & Rodriguez-Perales S. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun.* 5, 3964 (2014).

V

Vallejo S, Fleischer A, Martín JM, Sánchez A, Palomino E & Bachiller D. Generation of two induced pluripotent stem cells lines from Mucopolysaccharydosis IIIA patient: IME-DEAi004-A and IME-DEAi004-B. *Stem Cell Res.* 32, 110-114 (2018).

Vallejo-Diez S, Fleischer A, Martín-Fernández JM, Sánchez-Gilabert A & Bachiller D. Generation of two induced pluripotent stem cells lines from a Mucopolysaccharydosis IIIB (MPSIIIB) patient. *Stem Cell Res.* 33, 180-184 (2018).

Valstar MJ, Neijs S, Bruggenwirth HT, Olmer R, Ruijter GJ, Wevers RA, van Diggelen OP, Poorthuis BJ, Halley DJ & Wijburg FA. Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann Neurol.* 68, 876-887 (2010).

Valstar MJ, Ruijter GJ, van Diggelen OP, Poorthuis BJ & Wijburg FA. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J Inherit Metab Dis.* 31, 240-252 (2008).

Verhoeven WM, Csepán R, Marcelis CL, Lefeber DJ, Egger JI & Tuinier S. Sanfilippo B in an elderly female psychiatric patient: a rare but relevant diagnosis in presenile dementia. *Acta Psychiatr Scand.* 122, 162-165 (2010).

Verkhratsky A & Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 98, 239-389 (2018).

Volpi S, Yamazaki Y, Brauer PM, van Rooijen E, Hayashida A, Slavotinek A, Sun Kuehn H, Di Rocco M, Rivolta C, Bortolomai I, Du L, Felgentreff K, Ott de Bruin L, Hayashida K, Freedman G, Marcovecchio GE, Capuder K, Rath P, Luche N, Hagedorn EJ, Buoncompagni A, Royer-Bertrand B, Giliani S, Poliani PL, Imberti L, Dobbs K, Poulain FE, Martini A, Manis J, Linhardt RJ, Bosticardo M, Rosenzweig SD, Lee H, Puck JM, Zúñiga-Pflücker JC, Zon L, Park PW, Superti-Furga A & Notarangelo LD. EXTL3 mutations cause skeletal dysplasia, immune deficiency, and developmental delay. *J Exp Med.* 214, 623-637 (2017).

W

- Wagner VF & Northrup H. Mucopolysaccharidosis Type III. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019 (Sep 2019).
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F & Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 153, 910-918 (2013a).
- Wang S, Bates J, Li X, Schanz S, Chandler-Militello D, Levine C, Maherali N, Studer L, Hochedlinger K, Windrem M & Goldman SA. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*. 12, 252-64 (2013b).
- Wegrzyn G, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M, Piotrowska E, Narajczyk M, Kłoska A, Malinowska M, Dziedzic D, Gołbiewska I, Moskot M & Wegrzyn A. Genistein: a natural isoflavone with a potential for treatment of genetic diseases. *Biochem Soc Trans*. 38, 695-701 (2010).
- Wijburg FA, Whitley CB, Muenzer J, Gasperini S, Del Toro M, Muschol N, Cleary M, Sevin C, Shapiro E, Bhargava P, Kerr D & Alexanderian D. Intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with Sanfilippo syndrome type A: A phase IIb randomized trial. *Mol. Genet. Metab*. 126, 121-130 (2019).
- Wilbie D, Walther J & Mastrobattista E. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Acc Chem Res*. 52, 1555-1564 (2019).
- Willing AE, Garbuzova-Davis SN, Zayko O, Derasari HM, Rawls AE, James CR, Mervis RF, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N & Sanberg PR. Repeated administrations of human umbilical cord blood cells improve disease outcomes in a mouse model of Sanfilippo syndrome type III B. *Cell Transplant*. 23, 1613-30 (2014).
- Windrem MS, Schanz SJ, Morrow C, Munir J, Chandler-Militello D, Wang S & Goldman SA. A competitive advantage by neonatally engrafted human glial progenitors yields mice whose brains are chimeric for human glia. *J Neurosci*. 34, 16153-61 (2014).

X

- Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, Zu Y, Li W, Huang P, Tong X, Zhu Z, Lin S & Zhang B. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res*. 41, e141 (2013).

Y

- Yen J, Fiorino M, Liu Y, Paula S, Clarkson S, Quinn L, Tschantz WR, Klock H, Guo N, Russ C, Yu VWC, Mickanin C, Stevenson SC, Lee C & Yang Y. TRIAMF: A New Method for

Delivery of Cas9 Ribonucleoprotein Complex to Human Hematopoietic Stem Cells. *Sci Rep.* 8, 16304 (2018).

Yogalingam G & Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: Diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat.* 18, 264-281 (2001).

Z

Zelei T, Csetneki K, Vokó Z & Siffel C. Epidemiology of Sanfilippo syndrome: results of a systematic literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 13, 53 (2018).

Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV & Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 163, 759-771 (2015).

Zhang M, Wang F, Li S, Wang Y, Bai Y & Xu X. TALE: a tale of genome editing. *Prog Biophys Mol Biol.* 114, 25-32 (2014).

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O & Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 19, 1129-1133 (2001).

Zhang X, Wang F & Sheng J. "Coding" and "Decoding": hypothesis for the regulatory mechanism involved in heparan sulfate biosynthesis. *Carbohydr Res.* 428, 1-7 (2016).

Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, Marro S, Patzke C, Acuna C, Covey J, Xu W, Yang N, Danko T, Chen L, Wernig M & Südhof TC. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron.* 78, 785-98 (2013).

Zhao HG, Li HH, Bach G, Schmidtchen A & Neufeld EF. The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 6101-6105 (1996).

Zhao KW & Neufeld EF. Purification and characterization of recombinant human alpha-N-acetylglucosaminidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif.* 19, 202-11 (2000).

Zhu Y, Li X, Schuchman EH, Desnick RJ & Cheng SH. Dexamethasone-mediated up-regulation of the mannose receptor improves the delivery of recombinant glucocerebrosidase to Gaucher macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* 308, 705-11 (2004).

Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y & Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. *Science.* 334, 678–683 (2011).

Zunke F & Mazzulli JR. Modeling neuronopathic storage diseases with patient-derived culture systems. *Neurobiol Dis.* 127, 147-162 (2019).

AGRADECIMIENTOS



Un cop aquí és quan entra la nostàlgia.

No hagués arribat fins aquí si per allà el 2014 el Dani i la Lluïsa no haguessin confiat en mi per seguir aquell projecte de l'Isaac durant el màster. I vaja quin projecte! Una tesis sencera! Gràcies per aquella oportunitat i per seguir recolzant-me en tot moment durant aquests anys. Però bé és cert que sense l'Isaac aquest projecte no seria el mateix. Ets un mar l'idees i innovació, eficiència en estat pur. Gràcies també, perquè m'has guiat en un projecte ple de sorpreses i sembla ser que al final tot va sortint bé. Jo encara ho estic començant a assimilar ara.

Tot i que el laboratori al complet ha vist l'evolució d'aquest projecte, sí que voldria agrair sobretot el treball i l'esforç de les persones que han anat participant junt amb mi. Moni, aún recuerdo cuando durante el máster ya picábamos juntas las iPSCs, nos traían fritas. Y quién iba a decir que te volverías a unir al “ente lyso” tiempo después para ayudarme a poner la guinda final a este proyecto. Gracias a ti, a tus benditas manos y a esas charlas en cultivos. Edgar, quants altibaixos! Diré en la meua defensa que era novata. Jo sols recordo els moments bons d'aquella etapa estrella, i mira que el que venen a ser resultats sortiren pocs, però els teus “jefa” animen a qualsevol. Sé que estàs ahí sempre, i que arribaràs molt lluny perquè ets un científic magnífic, y la alegría de la huerta. Y mira que por mucho que digas María, fue llegar tú y que todo empezara a salir rodado. Nos empapaste de esa frescura valenciana que a mi se me estaba oxidando ya, y antes de que Edgar nos abandonara, el “ente lyso” definitivo empezaba a tomar forma. Gracias por todos esos momentos y alegrías, aún recuerdo cuando conseguimos el primer mutante CRISPR/Cas9, estaba siendo el primer resultado bueno en mucho tiempo, y todo gracias a ti. I com a integrant final, la Laura. Gràcies per seguir-ho tot amb la Moni, sé que la distància no és la millor circumstància per a coordinar-nos, però sempre t'agrairé haver pogut tornar a la terreta més tranquil·la.

Però què dir de la gent del laboratori. Us anyoraré, i molt. Ara ja molts i moltes ens hem dispersat, però crec que aquesta ha estat una de les millors èpoques del laboratori, i haver coincidit amb tots vosaltres no pot ser casualitat. No m'atreveixo a dir noms que segur que m'oblido d'algú, però ja sabeu que sense vosaltres no hagués estat igual. Sé que ja res ho serà. Recordaré mil moments, rises, cotilleo a porta tancada, totes les coses bones. Gràcies per tot el recolzament i les alegries, haveu estat un pilar fundamental tots aquests anys.

I finalment a la meua família, que no tinc paraules per a descriure tot el que m'haveu aportat però espero que ho sapigueu. A mi família adoptada, por ser una fuente inagotable de ánimo. Als meus pares i la meua germana per creure en mi i saber desde el principi que podía arribar fins ací, sabeu com catapultar-me els ànims quan és necessari. Y a Ricardo, por ayudarme a encontrar mi camino, la aventura acaba de empezar.

ANEXO



Durante el desarrollo de esta tesis también he colaborado con otros grupos del Departament y una de esas colaboraciones dio lugar al artículo que se presenta en este ANEXO.



Research paper

DDC (AADC) expression is not regulated by NFAT5 (TonEBP) in dopaminergic neural cell lines

Laura Pineda-Cirera^{a,b,c,d}, Judit Cabana-Domínguez^{a,b,c,d}, Noelia Benetó^{a,b,c,d}, Héctor Díez^e, Concepció Arenas^a, Bru Cormand^{a,b,c,d,1,*}, Noèlia Fernández-Castillo^{a,b,c,d,1,*}

^a Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain

^d Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain

^e Minoryx Therapeutics, Mataró, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords

NFAT5

DDC

TonEBP

Hypertonic stress

Neural dopaminergic cell lines

SH-SY5Y

PC12

ABSTRACT

The nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5), also known as tonicity-responsive enhancer-binding protein (TonEBP), is a transcription factor that regulates osmoadaptive response in multiple tissues and is highly expressed in the developing central nervous system. A former study reported that NFAT5 activation through hypertonic stress increases the expression of the dopa decarboxylase enzyme (DDC), also known as aromatic-L-amino-acid decarboxylase (AADC), in human renal proximal tubule cells, leading to an increase of dopamine synthesis. In a previous study, we identified *NFAT5* as a candidate gene for cocaine dependence, a complex psychiatric disorder in which dopaminergic neurotransmission plays an important role. Therefore, under the hypothesis that NFAT5 may also affect dopamine levels in the nervous system through the regulation of *DDC* expression, we examined this regulation using two neural dopaminergic cell lines, SH-SY5Y and PC12. The effect of NFAT5 on the expression of the neuronal isoform of *DDC* was evaluated by qRT-PCR. Upon hypertonic stress, NFAT5 was activated and accumulated into the nuclei and, subsequently, the expression of *NFAT5* and its known targets sodium/myo-inositol cotransporter 1 (*SMIT*) and sodium chloride/taurine cotransporter (*TAUT*) increased, as expected. However, the expression of *DDC* decreased. When silencing the expression of *NFAT5* with a specific shRNA we observed that the downregulation of *DDC* is independent from NFAT5 in both cell lines and is due to hypertonic stress. In conclusion, NFAT5 does not regulate the expression of the neuronal isoform of *DDC* in neural dopaminergic cell lines and, consequently, it does not modulate dopamine synthesis through *DDC*.

1. Introduction

NFAT5 (TonEBP) is a transcription factor of the Rel family activated by hypertonicity that is ubiquitously expressed and is essential for the regulation of homeostasis under osmotic stress, and it has been especially related to immune system and inflammatory functions (Aramburu and López-Rodríguez, 2019; Ho, 2003; Lee et al., 2019). The activation of NFAT5, and its translocation to the nucleus, activates the expression of many genes, such as the osmolyte transporters *SMIT* (sodium/myo-inositol cotransporter) and *TAUT* (sodium chloride/taurine cotransporter), and it also activates its own transcription (Aramburu et al., 2006; Halterman et al., 2012; Loyher et al., 2004). It has been reported that an acute hypertonic injection in rats increases the amount of NFAT5 protein in the nuclei of neuron cells (Maallem et al., 2006a,b). However, NFAT5 is not only regulated by tonicity, and it can also be activated through other stimuli in hypertonic and isotonic tissues (Halterman et al., 2012). *NFAT5* is expressed in the adult brain, but it is also highly and specifically expressed in the developing brain at embryonic stages, suggesting its importance in embryogenesis and cellular homeostasis (Loyher et al., 2004; Yang et al., 2018). NFAT5 function in the brain varies among cell types. For exam-

rine cotransporter), and it also activates its own transcription (Aramburu et al., 2006; Halterman et al., 2012; Loyher et al., 2004). It has been reported that an acute hypertonic injection in rats increases the amount of NFAT5 protein in the nuclei of neuron cells (Maallem et al., 2006a,b). However, NFAT5 is not only regulated by tonicity, and it can also be activated through other stimuli in hypertonic and isotonic tissues (Halterman et al., 2012). *NFAT5* is expressed in the adult brain, but it is also highly and specifically expressed in the developing brain at embryonic stages, suggesting its importance in embryogenesis and cellular homeostasis (Loyher et al., 2004; Yang et al., 2018). NFAT5 function in the brain varies among cell types. For exam-

Abbreviations: NFAT5, nuclear factor of activated T-cells 5; TonEBP, tonicity-responsive enhancer-binding protein; DDC, dopa decarboxylase; AADC, aromatic-L-amino-acid decarboxylase; *SMIT*, sodium/myo-inositol cotransporter 1; *TAUT*, sodium chloride/taurine cotransporter; *AQP4*, aquaporin 4; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *PGK1*, phosphoglycerate kinase 1; NaCl, sodium chloride; RNase, ribonuclease; cDNA, DNA complementary to RNA; shRNA, short hairpin RNA; PCR, polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative polymerase chain reaction; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole stain; ANOVA, analysis of variance.

* Corresponding authors at: Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

E-mail addresses: bcormand@ub.edu (B. Cormand); noefernandez@ub.edu (N. Fernández-Castillo)

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144569>

Received 17 July 2019; Received in revised form 21 January 2020; Accepted 8 March 2020

Available online xxx

0378-1119/© 2020.

ple it protects neurons against ischemic damage, may participate in inflammation in microglia, regulates the expression of *AQP4* in astrocytes and could influence dopaminergic neurotransmission (Jeong et al., 2016; Mak et al., 2012; Yang et al., 2018; Yi et al., 2013).

In a previous study of our group, the *NFAT5* gene was found upregulated in a dopaminergic neuronal model after cocaine exposure, and it was also found to carry genetic risk variants predisposing to cocaine dependence (Fernández-Castillo et al., 2015). It has been suggested that *NFAT5* may participate in modulating dopamine levels in peripheral tissues through the direct regulation of *DDC*, an enzyme involved in dopamine synthesis (Hsin et al., 2011). The authors observed that the expression of *DDC* was upregulated by *NFAT5* (TonEBP) in cells of the human renal proximal tubule (HK-2) and that this resulted in increased dopamine levels (Hsin et al., 2011). This connection between *NFAT5* and dopamine is interesting, since addiction is a neuropsychiatric disorder in which this neurotransmitter (and also serotonin) plays an important role by mediating the effects of the drug on the reward system (Volkow et al., 2017).

DDC (also known as AADC, EC 4.1.1.28), the aromatic L-amino acid decarboxylase, catalyses the synthesis of dopamine and serotonin, which act as neurotransmitters and hormones in neural and endocrine tissues. Dopaminergic (and also serotonergic) neurotransmission in the brain plays a key role in several neuropsychiatric disorders, including addiction. The *DDC* gene has two tissue-specific isoforms that differ in their 5'UTR, one expressed in neuronal cell types and the other one in non-neuronal tissues (Ichinose et al., 1989).

Since *NFAT5* has been reported to be a transcription factor for *DDC* in human renal proximal tubule cells (Hsin et al., 2011), it has been suggested that *NFAT5* may also have a role in dopaminergic neurotransmission in brain (Yang et al., 2018). This would substantiate its possible contribution to cocaine addiction.

Therefore, the aim of the present study is to explore whether *NFAT5* regulates the expression of the *DDC* neuronal isoform in dopaminergic neural cell lines, modulating in consequence the production of dopamine in the brain.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and osmotic shock

PC12 cells from rat adrenal gland (ATCC) provided by Celltec UB were grown in RPMI medium supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% glutamine (Life Technologies), and SH-SY5Y cells from human neuroblastoma (ATCC) were grown in DMEM:F12 (50:50) medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies), both at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere incubator.

To activate and upregulate *NFAT5* we used a hypertonic stress procedure based on previous studies performed in brain (with sucrose) (Maallem et al., 2006a,b) or in neural cell lines (with NaCl) (Bitoun and Tappaz, 2000; Isaacks et al., 1994). Osmotic shock was performed at the same osmolality by adding a NaCl or sucrose solution to the medium up to 550 mOsm/Kg, examined by VAPRO 5520 osmometer (Wescor) to reach a hypertonic condition. Cells were exposed to the hypertonic medium for 6, 24, 36 or 48 h before RNA isolation. A total of five replicates per condition were performed.

2.2. PCR and quantitative real-time PCR

RNA isolation was performed with the High Pure RNA Isolation Kit (Roche) and quantified with Nanodrop (NanoDrop Technologies). RNA was retrotranscribed to cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse kit (Life Technologies) and RNase inhibitor (Applied Biosystems).

Since *DDC* has a neuronal and a non-neuronal isoform, we designed specific primers for the two isoforms to assess which ones are ex-

pressed in PC12 and SH-SY5Y by PCR. The primers used are indicated in Table S1. The expression of both isoforms was tested in PC12 and SH-SY5Y cells either not exposed to osmotic shock or exposed to 6 h of hypertonic stress with NaCl up to 550 mOsm/Kg. We used cDNA from rat liver and Hep3B cells as a positive control for the non-neuronal isoform. PCR products were resolved by electrophoresis on 2% agarose gels followed by staining with RedSafe (iNtRON Biotechnology).

The expression levels of *NFAT5* and *DDC* were assessed by quantitative PCR (qRT-PCR), as well as those of the *SMIT* and *TAUT* genes, known *NFAT5* targets. QRT-PCR experiments were performed using LightCycler® 480 SYBR Green I Master reagent (Roche) with the LightCycler® 480II system (Roche), and data were analyzed with the LightCycler® 480 Software, Version 1.5. For normalization, *GAPDH* and *PGK1* expression was used as a reference, which were stable across conditions. The primers used for this study are listed in Table S1.

2.3. Immunocytochemistry

PC12 or SH-SY5Y cells were stained during 15 min with Wheat germ agglutinin Alexa Fluor® 488 conjugate (Life Technologies) at 1:2000 in cold medium to stain the cellular membrane, fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.1 M glycine and 0.5% Tween solution. After blocking non-specific binding with 10% normal donkey serum (blocking solution, BS) for 1 h, we stained the samples during 1 h at 37 °C with the anti-*NFAT5* rabbit polyclonal primary antibody (Abcam) at 1:100 dilution in BS, 45 min at 37 °C with the donkey anti-rabbit IgG-Cy3 secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) at 1:400 in BS and finally, 10 min at RT with DAPI (Invitrogen) at 1:10,000 diluted in BS. Images were acquired with a Leica SP2 AOBs Confocal Microscope (Leica Microsystems) with 63×/1.32–0.6 oil immersion objective and they were analyzed using ImageJ (Schindelin et al., 2012).

2.4. *NFAT5* silencing, lentiviral production and infection

To silence *NFAT5* expression, we used an shRNA against *NFAT5* (shNFAT5 5'-GGTCAAACGACGAGATTGTGA-3') previously used by others (Dreus-Elger et al., 2009). The shRNA was inserted into a psi-LVRU6P plasmid that includes the U6 promoter and a puromycin selection cassette (Genecopoeia). A scrambled shRNA was produced in the same plasmid backbone (Genecopoeia). We also used Tet-O-FUW-EGFP plasmid (Addgene) that contains the EGFP cassette under a tetracycline promoter and FUW-M2rtTA (Addgene) to quantify infection efficiency.

Third generation lentivirus particles were produced essentially as previously described (Ding and Kilpatrick, 2013). Briefly, the lentiviral expression vector (shRNAs or EGFP vectors) and three helper plasmids (pMD2.G, pMDLg/pRRE and pRSV-Rev (Addgene)) were cotransfected into HEK293T plated in T175 flasks using calcium phosphate transfection method, considering a 10:3:4:2 plasmid ratio respectively with a total amount of 142 µg. The medium was replaced 24 h after transfection and viral supernatants were collected 24–30 h later and filtered through a 0.45 µm filter. Finally, supernatants were ultracentrifuged and resuspended in 100 µl of DMEM medium.

PC12 cells or SH-SY5Y cells were plated in six-wells plates and infected with 0.8 µl of concentrated lentiviral particles in fresh medium with polybrene (6.5 µg/mL) (Sigma). Viral medium was removed after 24 h and replaced with fresh medium or fresh medium containing doxycycline (0.5 µg/mL) (Merck) for genes under tetracycline promoter. Twenty-four hours later, the osmotic shock was performed during 6, 24, 36 or 48 h with NaCl as described above. A total of five replicates per condition were performed.

2.5. Statistical analysis

The data in all figures were presented as mean $\pm$ SD. The analyses of the effect of NFAT5 activation under hypertonic stress on *SMIT*, *TAUT* and *DDC* expression were performed with one-way ANOVA. Gaussian Generalized Linear Models were used to investigate the possible effect of *NFAT5* on the *SMIT*, *TAUT* and *DDC* expression in the experiments silencing *NFAT5*. In all the analyses, when necessary for normality assumption, log transformation was made. All computations were performed in R version 3.4.1 (R Core Team, 2014) and a value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

The aim of the present study is to explore whether NFAT5, previously shown to modulate dopamine levels in renal tubule cells through activation of the DDC enzyme, also regulates the expression of the DDC neuronal isoform in two dopaminergic neural cell lines (PC12 and SH-SY5Y cells), therefore regulating dopamine levels in the brain. To

reach our objective, we activated NFAT5 by inducing hypertonic stress with salt or sucrose up to 550 mOsm/Kg during 6, 24, 36 or 48 h, as previously used to activate NFAT5 in neural cell lines (Bitoun and Tapaz, 2000; Isaacks et al., 1994).

First, we inspected which DDC isoforms were expressed in PC12 and SH-SY5Y and we determined that both cell lines express only the neuronal isoform in both conditions, with or without hypertonic stress (Fig. S1).

When activation of NFAT5 was induced under hypertonic stress (550 mOsm/kg) with salt (NaCl) we observed an expected significant upregulation of *NFAT5* expression, both in PC12 and in SH-SY5Y cells (Fig. 1). Similar results were observed when hypertonic stress was induced with sucrose at the same osmolality (Fig. S2). Immunocytochemistry demonstrated that the NFAT5 protein was translocated into the nuclei and therefore activated upon hypertonic stress with salt in both cell lines (Fig. 2). The genes *SMIT* and *TAUT*, known NFAT5 targets, were significantly upregulated under hypertonic stress with salt as expected, and the expression of *NFAT5* also increased significantly, which confirms the actual activation of the transcription factor

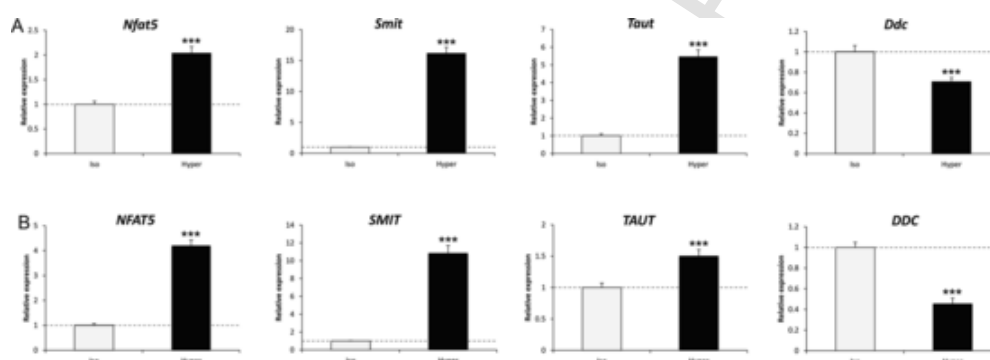


Fig. 1. Gene expression response to hypertonic stress. Cells were exposed to an osmotic shock with salt (NaCl) at 550 mOsm/kg during 6 h. A) PC12 cell line B) SH-SY5Y cell line. Mean and SD is shown. *** $P < 0.001$ when compared to isotonic condition. Expression levels were normalized using *GAPDH* expression. Similar results were obtained when normalizing with *PGK1*.

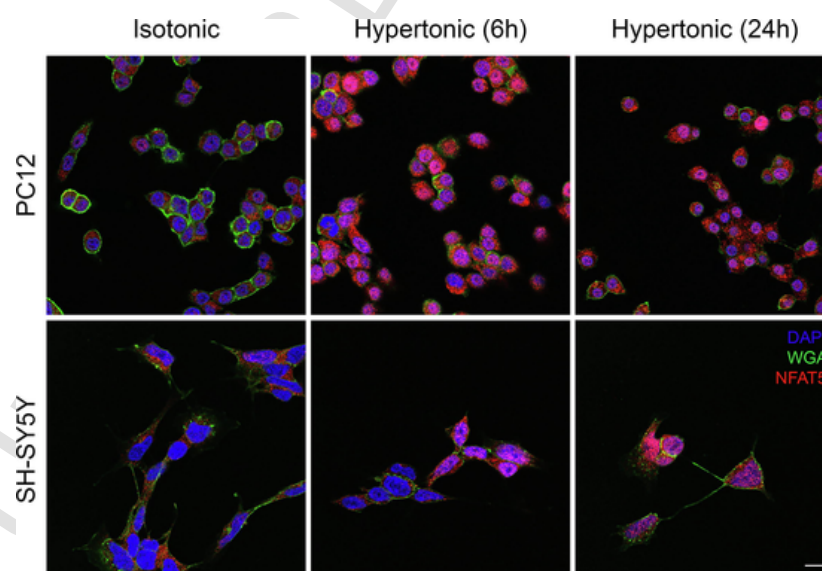


Fig. 2. Immunocytochemistry images showing the translocation of NFAT5 (in red) from the cytoplasm to the nucleus of the cells after a hypertonic stress. Cells were exposed to an osmotic shock with salt (NaCl) at 550 mOsm/kg during 6 h or 24 h. NFAT5 (TonEBP) was visualized using an antibody targeting its C-terminal segment (red), DAPI (blue) was used to stain the nuclei and WGA (green) was used to stain the membrane. Scale bar: 10 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

NFAT5 in both cell lines (Fig. 1). However, the expression of *DDC* decreased significantly in PC12 and in SH-SY5Y (Fig. 1), contrarily to the effect reported in renal proximal tubule cells (Hsin et al., 2011). Similar results were observed when both cell lines were exposed to hypertonic stress with sucrose (Fig. S2). So, for subsequent experiments we only induced hypertonic stress with salt, more used in neural cell culture studies (Bitoun and Tappaz, 2000; Isaacks et al., 1994).

In order to confirm that NFAT5 does not regulate the expression of *DDC* in these cell lines, we silenced *NFAT5* using a specific shRNA that inhibited its expression about 50% (Figs. 3 and 4). Hypertonic stress increased the expression (through NFAT5) of the targets of NFAT5-activated transcriptional activity *SMIT* and *TAUT*. When NFAT5 was si-

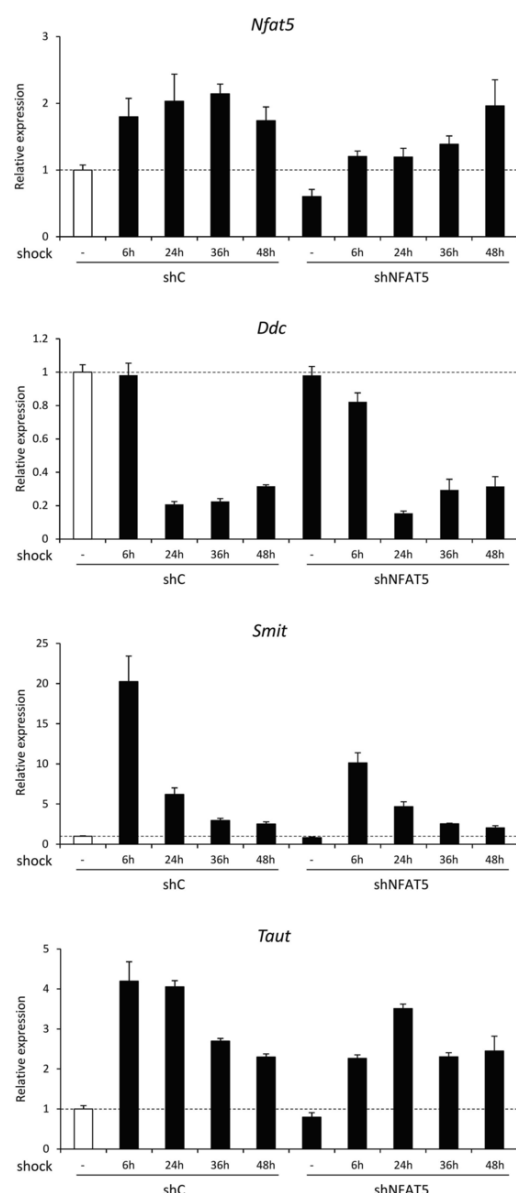


Fig. 3. Gene expression response to hypertonic stress in PC12 cells. Cells were exposed to an osmotic shock at 550 mOsm/kg during a 6, 24, 36 or 48 h treatment with salt (NaCl), with or without NFAT5 silencing. Two different shRNA were used, one against *Nfat5* (shNFAT5) and a scrambled shRNA as a control (shC). Mean and SD is shown. Expression levels were normalized using *Gapdh* expression.

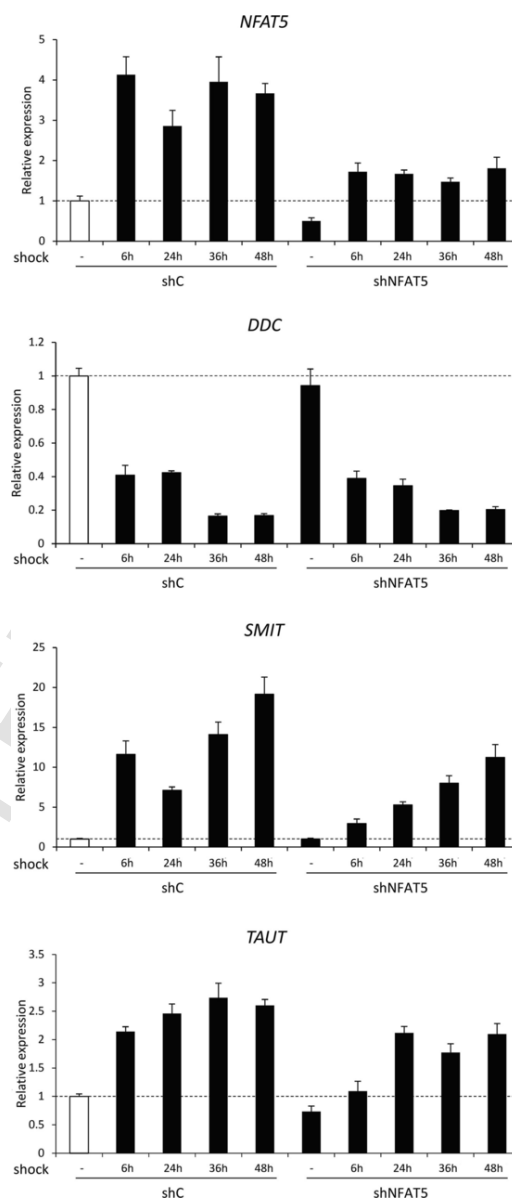


Fig. 4. Gene expression response to hypertonic stress in SH-SY5Y cells. Cells were exposed to an osmotic shock at 550 mOsm/kg during a 6, 24, 36 or 48 h treatment with salt (NaCl), with or without NFAT5 silencing. Two different shRNA were used, one against NFAT5 (shNFAT5) and a scrambled shRNA as a control (shC). Mean and SD is shown. Expression levels were normalized using *GAPDH* expression.

lenced, the transcription levels of both genes decreased compared to the control in the two cell lines, indicating an actual downregulation of NFAT5 activity by the shRNA (Figs. 3 and 4). In contrast, the combination of NFAT5 inhibition and hypertonic stress resulted in a reduction of DDC expression similar to that observed when NFAT5 is not silenced (using a control shRNA) (Figs. 3 and 4). We observed a 70–80% decrease of DDC expression upon 24 h of hypertonic shock in PC12 (Fig. 3) and 60–80% upon 6 h of hypertonic shock in SH-SY5Y (Fig. 4). These results suggest that, in contrast to SMIT and TAUT, the expression of the neuronal isoform of DDC is regulated through a mechanism that is independent from NFAT5 in PC12 and in SH-SY5Y cells.

Then, we assessed the effect of NFAT5 on the expression of these three genes using a generalized linear model. As reported previously (Aramburu et al., 2006; Halterman et al., 2012; Loyher et al., 2004), NFAT5 showed a significant effect on *SMIT* and *TAUT* expression in PC12 ($P = 2.23\text{E}-04$ and $P = 6.05\text{E}-04$, respectively) and SH-SY5Y ($P = 1.34\text{E}-03$ and $P = 4.62\text{E}-02$, respectively), both increasing their expression when NFAT5 is upregulated, reinforcing their value as targets of NFAT5-regulated transcriptional activity (Figs. 3 and 4 and Table S2). On the other hand, NFAT5 had no significant effect on the expression of *DDC* in PC12 ($P = 0.13$) nor in SH-SY5Y ($P = 0.48$) (Figs. 3 and 4 and Table S2). Furthermore, we observed that the expression of *DDC* decreased significantly by the effect of the osmotic shock upon 24 h in PC12 ($P < 2\text{E}-16$), and at all time points in SH-SY5Y ($2\text{E}-16 < P < 1.27\text{E}-08$) (Figs. 3 and 4 and Table S2).

4. Discussion

The present study suggests that NFAT5 is not involved in dopamine neurotransmission in the nervous system (a hypothesis that had previously been formulated (Fernández-Castillo et al., 2015; Yang et al., 2018)), at least through the regulation of the expression of *DDC*. Our work in dopaminergic neural-like cells shows NFAT5 does not regulate the neuronal isoform of *DDC*, contrarily to what had been reported in renal tubular cells, where hypertonicity activates NFAT5, which in turn upregulates the non-neuronal isoform of *DDC*, increasing the levels of dopamine (Hsin et al., 2011). Our group previously described that NFAT5 was upregulated by cocaine and that genetic risk variants in this gene were associated with cocaine dependence, a complex psychiatric disorder in which dopaminergic neurotransmission plays an important role (Volkow et al., 2017). We therefore hypothesized that NFAT5 could also regulate *DDC* in the brain, activating its expression and leading to an increase of dopamine, a neurotransmitter involved in reward and motivation, important for addiction, but also related to other neuropsychiatric disorders. However, rather than observing an upregulation of *DDC*, we detected a decrease of *DDC* expression after the activation of NFAT5 through hypertonic stress in dopaminergic neural-like cell lines. Subsequently, we demonstrated that this decrease in the expression of the neuronal isoform of *DDC* was due to hypertonic stress and independent from NFAT5 regulation.

Our results indicate that NFAT5 was expressed and translocated into the cell nuclei, where it becomes an active transcription factor, as shown by immunocytochemistry and by the increased expression of two known target genes and itself (Figs. 1 and 2), consistent with previous studies (Aramburu et al., 2006; Halterman et al., 2012; Loyher et al., 2004). But NFAT5 does not seem to regulate *DDC* expression in dopaminergic neural cell lines, in contrast to the results reported by Hsin et al. in renal proximal tubule cells (Hsin et al., 2011). Thus, NFAT5 regulates the expression of the non-neuronal isoform of *DDC* but not that of the neuronal isoform. However, we cannot discard that NFAT5 may play a role in the regulation of dopamine levels in the brain not through *DDC*. We also show that the neuronal isoform of *DDC* is downregulated by osmotic shock in the two investigated neural cell lines. This observation goes in the opposite direction to what is seen in renal tubule cells, where dopamine has a role in regulating natriuresis. One possible explanation may be that the neuronal isoform of *DDC* is not involved in the osmoadaptive response mediated by dopamine and *DDC* would be downregulated as part of the transcription repression generated by a cell adaptation process (Burg et al., 2007) in neural cell lines.

There are some strengths and limitations in our study that should be discussed. Strengths: (i) Comparable results have been obtained for the two dopaminergic neural cell lines studied (PC12 and SH-SY5Y), (ii) expression changes are maintained up to 48 h, (iii) similar expression changes were obtained when hypertonic stress was induced with sucrose or with NaCl at the same osmolality, (iv) we confirmed that

both cell lines (PC12 and SH-SY5Y) express only the neuronal isoform of the *DDC*. Limitations: (i) The mechanism by which hypertonic stress modulates the expression of the neuronal isoform of *DDC* in PC12 and in SH-SY5Y cells has not been studied by us, (ii) NFAT5 may be involved in the regulation of dopamine levels through another mechanism not considered in the present study and (iii) what we see in these two neural cell lines may differ from actual mechanisms in the brain.

To sum up, we observed that the expression of the neuronal isoform of *DDC* is independent from NFAT5 regulation in two dopaminergic neural cell lines (PC12 and SH-SY5Y) upon hypertonic stress.

CRedit authorship contribution statement

Laura Pineda-Cirera: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Judit Cabana-Domínguez:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Noelia Benetó:** Methodology, Writing - review & editing. **Héctor Díez:** Methodology, Writing - review & editing. **Concepció Arenas:** Formal analysis, Writing - review & editing. **Bru Cormand:** Conceptualization, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Noèlia Fernández-Castillo:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: The funder Minoryx Therapeutics provided support in the form of salaries for author HD, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. All other authors declare no competing interests.

Acknowledgements

We are thankful to Jose Francisco Aramburu (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona) for helpful advice on several experiments and also for the use of the VAPRO 5520 osmometer of his laboratory. We are also grateful to Isaac Canals for help with the lentivirus production and for kindly providing the plasmids needed.

This work was supported mainly by the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' [grant number SAF2015-68341-R and RTI2018-100968-B-I00] and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' [grant number 2017-SGR-738]. BC also received funding from the European Union H2020 Program [H2020/2014-2020, grant agreement 667302 and 728018]. CA has received funding from and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' [grant number 2017-SGR-622]. LP-C and JC-D were supported by 'Generalitat de Catalunya' [grant numbers 2016 FI-B 00728 and 2015 FI-B 00448, respectively]. LP-C was also supported by 'Ministerio de Educación, Cultura y Deporte' [grant number FPU15/03867]. NF-C is supported by a contract of the 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER).

The funder Minoryx Therapeutics provided support in the form of salaries for author HD, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144569>.

References

- Aramburu, J., Drews-Elger, K., Estrada-Gelonch, A., Minguión, J., Moranco, B., Santiago, V., López-Rodríguez, C., 2006. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1597–1604.
- Aramburu, J., López-Rodríguez, C., 2019. Regulation of inflammatory functions of macrophages and T lymphocytes by NFAT5. *Front. Immunol.* 10, 535.
- Bitoun, M., Tappaz, M., 2000. Gene expression of the transporters and biosynthetic enzymes of the osmolytes in astrocyte primary cultures exposed to hyperosmotic conditions. *Glia* 32, 165–176.
- Burg, M. B., Ferraris, J. D., Dmitrieva, N. I., 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol. Rev.* 87, 1441–1474.
- Ding, B., Kilpatrick, D. L., 2013. Lentiviral vector production, titration, and transduction of primary neurons. In: Zhou, R., Mei, L. (Eds.), *Neural Development. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 119–131.
- Drews-Elger, K., Ortells, M. C., Rao, A., López-Rodríguez, C., Aramburu, J., 2009. The transcription factor NFAT5 is required for cyclin expression and cell cycle progression in cells exposed to hypertonic stress. *PLoS One* 4, e5245.
- Fernández-Castillo, N., Cabana-Domínguez, J., Soriano, J., Sánchez-Mora, C., Roncero, C., Grau-López, L., Ros-Cucurull, E., Daigre, C., van Donkelaar, M. M. J., Franke, B., Casas, M., Ribasés, M., Cormand, B., 2015. Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. *Transl. Psychiatry* 5, e667.
- Halterman, J. A., Kwon, H. M., Wamhoff, B. R., 2012. Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C1–C8.
- Ho, S. N., 2003. The role of NFAT5/TonEBP in establishing an optimal intracellular environment. *Arch. Biochem. Biophys.* 413, 151–157.
- Hsin, Y. H., Tang, C. H., Lai, H. T., Lee, T. H., 2011. The role of TonEBP in regulation of AAD expression and dopamine production in renal proximal tubule cells upon hypertonic challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 598–603.
- Ichinose, H., Kurosawa, Y., Titani, K., Fujita, K., Nagatsu, T., 1989. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1024–1030.
- Isaacs, R. E., Bender, A. S., Kim, C. Y., Prieto, N. M., Norenberg, M. D., 1994. Osmotic regulation of myo-inositol uptake in primary astrocyte cultures. *Neurochem. Res.* 19, 331–338.
- Jeong, G. R., Im, S.-K., Bae, Y.-H., Park, E. S., Jin, B. K., Kwon, H. M., Lee, B.-J., Bu, Y., Hur, E.-M., Lee, B. D., 2016. Inflammatory signals induce the expression of tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP) in microglia. *J. Neuroimmunol.* 295, 21–29.
- Lee, N., Kim, D., Kim, W.-U., 2019. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 10, 270.
- Loyer, M. L., Mutin, M., Woo, S. K., Kwon, H. M., Tappaz, M. L., 2004. Transcription factor tonicity-responsive enhancer-binding protein (TonEBP) which transactivates osmoprotective genes is expressed and upregulated following acute systemic hypertonicity in neurons in brain. *Neuroscience* 124, 89–104.
- Maallem, S., Berod, A., Mutin, M., Kwon, H. M., Tappaz, M. L., 2006. Large discrepancies in cellular distribution of the tonicity-induced expression of osmoprotective genes and their regulatory transcription factor TonEBP in rat brain. *Neuroscience* 142, 355–368.
- Maallem, S., Mutin, M., Kwon, H. M., Tappaz, M. L., 2006. Differential cellular distribution of tonicity-induced expression of transcription factor TonEBP in the rat brain following prolonged systemic hypertonicity. *Neuroscience* 137, 51–71.
- Mak, K. M. C., Lo, A. C. Y., Lam, A. K. M., Yeung, P. K. K., Ko, B. C. B., Chung, S. S. M., Chung, S. K., 2012. Nuclear Factor of Activated T Cells 5 Deficiency Increases the Severity of Neuronal Cell Death in Ischemic Injury. *Neurosignals* 20, 237–251.
- R Core Team, 2014. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Volkow, N. D., Wise, R. A., Baler, R., 2017. The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 741–752.
- Yang, X.-L., Wang, X., Peng, B.-W., 2018. NFAT5 has a job in the brain. *Rev. Dev. Neurosci.* 40, 289–300.
- Yi, M.-H., Lee, Y. S., Kang, J. W., Kim, S. J., Oh, S.-H., Kim, Y. M., Lee, Y. H., Do Lee, S., Kim, D. W., 2013. NFAT5-dependent expression of AQP4 in astrocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 223–232.

