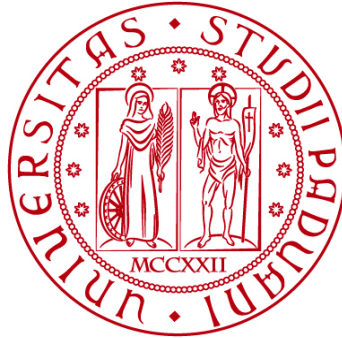


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

# **Eliminazione di DNA mitocondriale mutato attraverso l'uso di meganucleasi**

**Tutor: Prof. Carlo Fiore Viscomi  
Dipartimento di Scienze Biomediche**

**Co-tutor: Dott.ssa Valeria Balmaceda  
Fondazione Ricerca Biomedica Avanzata VIMM**

**Laureanda: Elena Bruscaignin**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# INDICE

<b>Abstract</b> .....	1
<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b> .....	2
1.1 Le malattie mitocondriali.....	2
1.2 Patologie associate alla mutazione m.5024C>T in mt-tRNA <sup>Ala</sup> .....	2
1.3 Stato dell'arte: strategie testate.....	3
1.3.1 Nucleasi mitocondriali.....	3
1.3.2 Approcci di modifica di basi.....	5
1.3.3 Approcci basati su acidi nucleici.....	6
<b>CAPITOLO 2: RISULTATI</b> .....	7
2.1 Progettazione del vettore.....	7
2.2 Test in cellule in coltura.....	8
2.3 Test <i>in vivo</i> .....	9
2.3.1 Test in topi giovani.....	9
2.3.2 Test in topi adulti.....	10
2.4 Ripristino dei livelli di mt-tRNA <sup>Ala</sup> .....	11
<b>CAPITOLO 3: APPROCCIO SPERIMENTALE</b> .....	12
3.1 Western blot.....	12
3.2 Immunofluorescenza .....	13
3.3 Estrazione del DNA, quantificazione e analisi RFLP.....	13
3.4 Colorazione ematossilina eosina.....	14
3.5 Rilevamento di tagli <i>off-target</i> nucleari.....	14
3.6 Northern blot.....	14
3.7 Real time PCR.....	15
<b>CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONE</b> .....	16
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	18



## **Abstract**

Le malattie mitocondriali sono malattie genetiche che colpiscono la catena respiratoria mitocondriale e di conseguenza la produzione di ATP. Possono essere dovute a mutazioni sia del DNA mitocondriale (mtDNA) sia del genoma nucleare: il mtDNA è presente in numero variabile da 1.000 a 10.000 copie per cellula, che possono essere uguali – tutte sane o tutte mutate – quando una cellula è omoplasmica, oppure diverse tra loro in cellule eteroplasmiche, con diversi gradi di mtDNA mutato e conseguente variabilità nel fenotipo patologico.

Il DNA mitocondriale non può essere geneticamente modificato con i sistemi tradizionali di biologia molecolare, per cui, al momento, non esistono terapie o cure per le malattie legate a mutazioni nel mtDNA. Sono state testate endonucleasi come ZFNs e TALENs che, nonostante abbiano portato a riduzione dell'eteroplasmia, presentano alcune problematiche quali grandi dimensioni e scarsa flessibilità. È stata quindi esaminata l'efficienza della meganucleasi mitoARCUS, che ha dimensioni ridotte ed è in grado di distinguere differenze in singole basi. È stata costruita una meganucleasi diretta contro la mutazione m.5024C>T nel gene murino codificante il tRNA mitocondriale dell'amminoacido alanina (mt-tRNA<sup>Ala</sup>). Dopo iniezione per via intravenosa usando un vettore virale AAV9 si è osservata l'eliminazione selettiva del mtDNA mutato in fegato e muscolo dell'organismo modello. MitoARCUS costituisce pertanto una possibile terapia efficace per le malattie mitocondriali.

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 Le malattie mitocondriali

Le malattie mitocondriali sono un variegato gruppo di patologie genetiche dovute a mutazioni del DNA mitocondriale e nucleare. Il DNA mitocondriale è una molecola circolare a doppio filamento di 16.596 basi nell'uomo che risiede nelle cellule in numero di copie variabile da 1.000 a 10.000 circa. Esso presenta 37 geni che codificano per 13 proteine essenziali per la fosforilazione ossidativa (OXPHOS), 22 tRNA e 2 rRNA e le mutazioni che affliggono questo genoma possono ritrovarsi in ciascuna di queste regioni [2]. Le malattie mitocondriali possono essere anche dovute a mutazioni del genoma nucleare poiché più di 1.000 proteine necessarie al funzionamento mitocondriale sono codificate dal DNA nucleare: l'omeostasi ed il mantenimento dei mitocondri sono quindi geneticamente controllati da entrambi i DNA, mitocondriale e nucleare. Nonostante siano considerate rare, le malattie mitocondriali sono uno dei gruppi principali di disturbi neurologici ereditabili, con una frequenza di circa 1 ogni 5.000 nella popolazione generale [3]. Sono state identificate oltre 250 mutazioni patogenetiche del mtDNA che possono causare problemi di diverso tipo, tendenzialmente multi-sistemiche [1]: le malattie mitocondriali sono infatti clinicamente e geneticamente eterogenee e possono manifestarsi a qualsiasi età, colpendo anche diversi organi contemporaneamente, prevalentemente quelli a più elevate necessità energetiche come cervello e cuore [3]. Esempi di patologie mitocondriali sono atrofia ottica, cardiomiopatie e neurodegenerazione [1]. I sintomi sono eterogenei anche in pazienti che riportano lo stesso tipo di mutazione a causa dell'eteroplasmia che caratterizza questo tipo di patologie: mtDNA mutato e *wild-type* possono coesistere all'interno di una stessa cellula che viene quindi definita eteroplasmica; dev'essere raggiunta una soglia di mtDNA mutato per compromettere le funzionalità cellulari e per la manifestazione della patologia [1]. Le manifestazioni cliniche che derivano da difetti di OXPHOS, ad esempio, richiedono che il DNA mitocondriale mutato superi il 60-90% del mtDNA totale, poiché la probabilità di sviluppo della malattia dipende dal livello di eteroplasmia [3]. L'ereditarietà mitocondriale è esclusivamente materna: l'eteroplasmia variabile è infatti un fenomeno che deriva da un processo definito "collo di bottiglia mitocondriale" durante la gametogenesi femminile, che comporta una riduzione del numero di copie di mtDNA nelle cellule germinali primordiali e una successiva replicazione di questa popolazione di mtDNA durante la maturazione dell'ovocita. Questo evento può portare ad una variazione del bilancio di mtDNA mutato (*mutation load*) tra le generazioni, procurando diversi livelli di mtDNA mutante nelle proli di madri portatrici di mutazioni patogene [3].

## 1.2 Patologie associate alla mutazione m.5024C>T in mt-tRNA<sup>Ala</sup>

La mutazione in esame si colloca nel gene mitocondriale murino codificante per il tRNA dell'amminoacido alanina (mt-tRNA<sup>Ala</sup>), precisamente nella sequenza [5'-ATAAGGATTTGTAAGACTTCATC-3'] [1]: si tratta di una mutazione significativa poiché equivalente alla sostituzione patogena umana m.5650G>A che causa una cardiomiopatia mitocondriale. Anche i modelli murini mutanti, infatti, a livelli di eteroplasmia superiori al 60% sviluppano cardiopatia ipertrofica e difetti cardiaci associati in età adulta. Poiché la sostituzione nucleotidica risiede nel gene

codificante per il mt-tRNA dell'amminoacido alanina, questa mutazione comporta anche una sostanziale diminuzione di questo tRNA e alterazione di traduzione mitocondriale.

La mutazione considerata rappresenta un rilevante modello di studio poiché le malattie mitocondriali dovute a mutazioni dei mt-tRNA sono il gruppo più numeroso di questo tipo di patologie perché affliggono oltre il 50% dei pazienti [3].

### 1.3 Stato dell'arte: strategie testate

Non sono al momento disponibili terapie curative per le malattie mitocondriali date da mutazioni del mtDNA, esistono infatti solo trattamenti palliativi che però non sono indirizzati alla causa di questo tipo di patologie, ovvero l'alto livello di mtDNA mutato. Negli anni sono stati testati diversi metodi di *editing* genomico, ponendo una particolare attenzione al mantenimento del numero di copie di mtDNA all'interno della cellula [2].

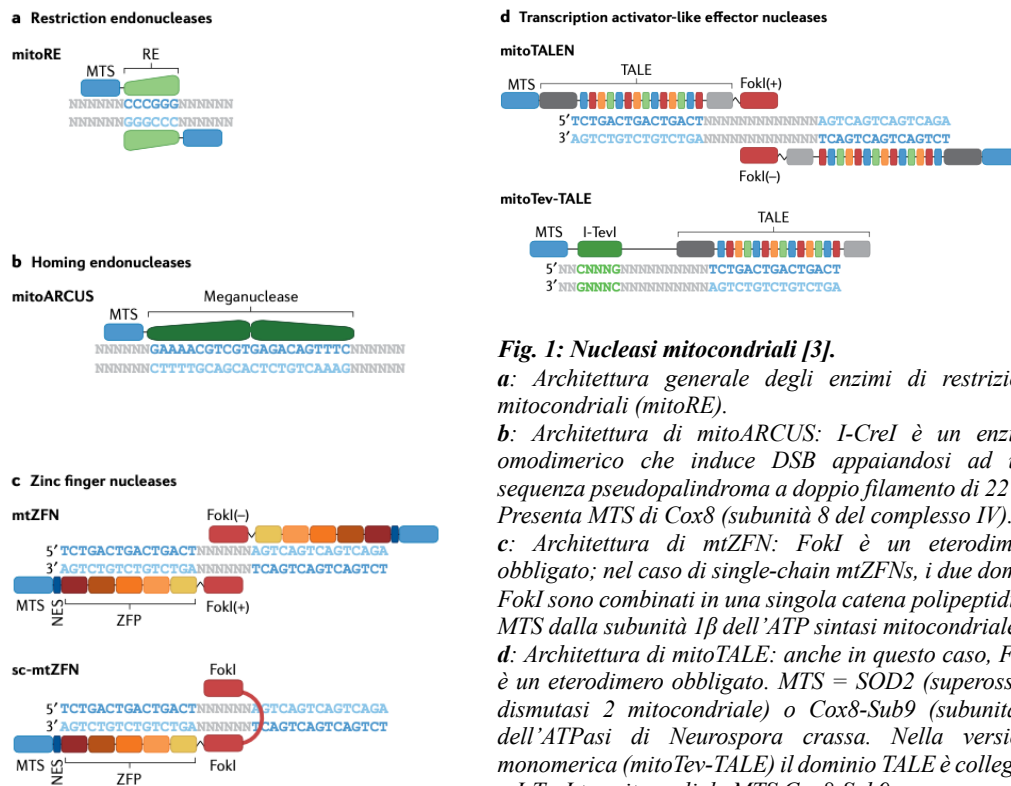
#### 1.3.1 Nucleasi mitocondriali

Gli approcci basati sull'utilizzo di nucleasi mitocondriali sfruttano il riconoscimento e taglio di specifiche sequenze di mtDNA: il punto di forza di questa strategia risiede nella rapida degradazione delle molecole di mtDNA tagliate, che non vengono quindi riparate ma direttamente eliminate. Il rimanente DNA mitocondriale potrà quindi replicarsi per ripristinare i livelli ottimali di DNA. Un problema potrebbe insorgere se la nucleasi riconoscesse delle sequenze *off-target*, poiché porterebbe ad una deplezione troppo elevata [2]. Alcune nucleasi utilizzate per questo tipo di metodi sono le mitoRE (endonucleasi di restrizione mitocondriali), che riconoscono sequenze di DNA ed operano un taglio a doppio filamento (DSB). Essendo il DNA nucleare di dimensioni enormemente maggiori rispetto al mtDNA, gli enzimi di restrizione lo taglierebbero più spesso: ecco perché alle endonucleasi mitocondriali è stato aggiunto anche un segnale di target mitocondriale (MTS) che permetta un riconoscimento più mirato (**Fig. 1a**) [2]. MitoPstI è stata infatti la prima nucleasi introdotta con successo, in grado di operare uno spostamento dell'eteroplasmia in una linea cellulare ibrida contenente cellule di topo e ratto [3]. Sono poi state testate altre nucleasi, tra cui mitoSmaI – diretta contro la mutazione patogena m.8399G associata alle sindromi di NARP e Leigh – e mitoApaLI nel modello murino NZB/BALB, portatore di due diversi aplotipi distinti per la presenza (BALB) o assenza (NZB) del sito di restrizione riconosciuto da questo enzima. Questa strategia dipende però in gran parte da mutazioni spontanee che creano siti unici di restrizione, evento che risulta essere piuttosto raro (fatta eccezione per SmaI sopra citato, indirizzato espressamente verso quella mutazione). Per diversi motivi questo approccio risulta quindi poco versatile [2]. Uno strumento di modifica del mtDNA sono le nucleasi “dito di zinco o *zinc finger*” (mtZFNs): si tratta di enzimi chimerici composti dalla porzione Cys2His2 di *binding* al DNA (ZF) coniugata con la porzione catalitica C-terminale della nucleasi FokI [4]. Le mtZFN sono enzimi in grado di riconoscere specifici trinucleotidi, ma possono riconoscere sequenze più lunghe quando vengono uniti diversi domini di *binding* al DNA. I siti bersaglio delle mtZFN sono costituiti da due siti di legame delle ZF separati da una sequenza spaziatrice di 5-7 paia di basi (pb) riconosciuta dal dominio catalitico FokI [8]. FokI è un enzima di restrizione di tipo II [4] e il suo sito catalitico è stato modificato in modo renderlo un eterodimero obbligato [2]: le ZFN operano infatti come dimeri, permettendo così ai domini FokI di operare un

taglio a doppio filamento. Esiste anche una versione monomericamente di mtZFN (sc-mtZFN, *single-chain* mtZFN), sviluppata connettendo due domini FokI consecutivi con un linker flessibile. Oltre al MTS aggiunto all'N terminale di tutte le piattaforme di *editing*, nel caso delle mtZFNs viene aggiunto anche un segnale detto Segnale di Export Nucleare (NES) per reprimere le errate localizzazioni nucleari del costrutto (**Fig. 1c**). Un esperimento di successo è stato messo in atto a Cambridge, dove è stata costruita una ZFN indirizzata proprio contro la mutazione in esame m.5024C>T nel gene del tRNA<sup>Ala</sup> in topo. È stata effettuata un'iniezione intravenosa nella coda di topi dai 2 agli 8 mesi: a 65 giorni dall'iniezione, nel cuore si è osservata un'efficiente riduzione di eteroplasmia, i livelli di tRNA<sup>Ala</sup>, lattato e piruvato si sono normalizzati e la funzione dei mitocondri cardiaci è stata effettivamente ripristinata. La strategia delle mtZFNs è però piuttosto lunga nella selezione dei migliori candidati dimeri, poiché l'affinità e la specificità di ogni ZF dipendono fortemente dal contesto e di conseguenza molti dimeri candidati *in silico* si rivelano non funzionali. Un'ulteriore piattaforma è rappresentata da mitoTALENs, nucleasi *Transcription Activator Like-Effectors*, con dominio di *binding* al DNA formato da 33-35 amminoacidi (definiti TALE *repeats*). Gli amminoacidi in posizione 12 e 13 – detti “Repeat Variable Di-residue” (RVD) – determinano l'affinità della nucleasi per la porzione di DNA e se scelti appropriatamente permettono di riconoscere qualsiasi tipo di sequenza. Ogni monomero di mitoTALENs contiene un MTS, il dominio di *binding* TALE necessario e il dominio catalitico aspecifico di FokI in forma eterodimerica (**Fig. 1d**) [2]. L'enzima di restrizione FokI appartiene ad una classe inusuale di enzimi di restrizione che riconoscono una specifica sequenza di DNA e tagliano a qualche base di distanza da questa sequenza. Questa sua natura bipartita rappresenta un vantaggio nella creazione di nuovi enzimi, poiché il dominio di riconoscimento del DNA può essere sostituito con altri domini di riconoscimento (ZF o TALEN in questi casi) per avere la specificità desiderata, mentre il dominio catalitico opera aspecificamente [5]. La differenza di mitoTALEN rispetto alle mtZFNs consiste nel riconoscimento di una singola base da parte dei domini di *binding* al DNA, proprietà che permette una maggiore flessibilità di progettazione rispetto alle proteine a dito di zinco confinate in tripletta [6]. Si tratta inoltre di strutture più grandi delle mitoZFNs, ma quando testate hanno portato ad una buona riduzione di eteroplasmia in diversi casi: utilizzando sempre il modello murino m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup>, un paio di eterodimeri mitoTALENs sono stati inseriti in vettori virali di tipo AAV9 e iniettati per via retro-orbitale o intramuscolare in topi giovani, che dopo 4 settimane dall'iniezione hanno mostrato uno slittamento di eteroplasmia in muscolo scheletrico e cuore, con un recupero dei livelli di tRNA<sup>Ala</sup>. Anche in terapie embrionali questa strategia ha avuto un buon risultato, con riduzione dei genomi NZB negli oociti in modo che non potessero più essere trasmessi. Esiste anche una versione monomericamente definita mitoTev-TALE, che può essere veicolata con un unico vettore virale e non presenta il dominio catalitico di FokI ma l'endonucleasi di *homing* I-TevI che genera un DSB in mtDNA in qualsiasi sequenza 5'-CNNNG-3' [2]. Un altro approccio che vede protagonista un'endonucleasi di *homing* è definito mitoARCUS, strategia adottata dall'articolo in analisi. L'enzima è in questo caso I-CreI, proveniente dal genoma del cloroplasto di *Chlamydomonas reinhardtii* e facente parte della famiglia delle endonucleasi LAGLIDADG, dette “meganucleasi”. I-CreI si associa ad una sequenza palindroma di 22 pb ed è in grado di riconoscere e tagliare quasi qualsiasi tipo di sequenza di DNA (**Fig. 1b**). Le



endonucleasi mitoARCUS rappresentano un buon approccio in quanto sono di piccola taglia, monomeriche e riconoscono anche differenze di singola base [1]. Un ultimo approccio proposto basato sulle nucleasi è mitoCRISPR, proveniente dal *pathway* batterico di resistenza virale, proposto per la prima volta nel 2013 come approccio di *editing* genomico nucleare grazie alla sua capacità di riconoscimento di sequenza. Nella versione nucleare si basa sull'utilizzo di un RNA guida (gRNA) composto da due pezzi di RNA a singolo filamento con estremità 5' complementare ad una sequenza di DNA. Grazie al legame di questo gRNA all'endonucleasi Cas quest'ultima viene attivata ed è in grado di operare un DSB. Questo approccio purtroppo non è applicabile per modificare il mtDNA poiché non è possibile veicolare acidi nucleici all'interno dei mitocondri, ma se mai venisse scoperto un metodo per permetterne l'efficacia questo approccio rappresenterebbe una svolta nella terapia genica poiché più semplice da somministrare.



**Fig. 1: Nucleasi mitocondriali [3].**

**a:** Architettura generale degli enzimi di restrizione mitocondriali (mitoRE).

**b:** Architettura di mitoARCUS: I-CreI è un enzima omodimerico che induce DSB appaiandosi ad una sequenza pseudopalindroma a doppio filamento di 22 pb. Presenta MTS di Cox8 (subunità 8 del complesso IV).

**c:** Architettura di mtZFN: FokI è un eterodimero obbligato; nel caso di single-chain mtZFNs, i due domini FokI sono combinati in una singola catena polipeptidica. MTS dalla subunità 1β dell'ATP sintasi mitocondriale.

**d:** Architettura di mitoTALEN: anche in questo caso, FokI è un eterodimero obbligato. MTS = SOD2 (superossido dismutasi 2 mitocondriale) o Cox8-Sub9 (subunità 9 dell'ATPasi di *Neurospora crassa*). Nella versione monomeric (mitoTev-TALE) il dominio TALE è collegato a I-TevI tramite un link. MTS Cox8-Sub9.

### 1.3.2 Approcci di modifica di basi

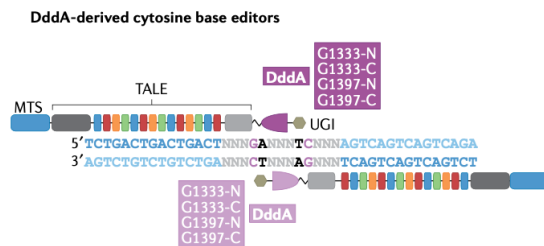
La svolta fornita dalla strategia di modificazione di basi è rappresentata dalla possibilità di correggere il mtDNA mutato senza eliminarlo: le nucleasi, invece, non sono in grado di operare una correzione e quindi non possono essere utili in caso di mutazioni omoplasmiche. Esistono molti enzimi in grado di operare transizioni C>T o A>G senza indurre DSB, si tratta di citosina o adenosina deaminasi, domini proteici che però operano su DNA a singolo filamento: è quindi necessario trovare dei domini di *binding* al DNA che si appaiano al singolo filamento oppure domini catalitici che sappiano lavorare su filamento doppio.

Un esempio è rappresentato da mitoDdCBE (*DddA-derived cytosine base editor*), *editor* di basi basato su DddA [2], deaminasi batterica che opera su citosine convertendole in uracile con preferenza per le C precedute da T. Il meccanismo si basa sulla fusione di due domini catalitici a due monomeri TALE: i domini catalitici

costituiscono la DddA<sub>tox</sub> – forma attiva – e operano la deaminazione su tutte le citosine tra i due domini di *binding* dei monomeri TALE. Nella proteina sintetica finale viene aggiunto anche un MTS ed un inibitore dell'uracil-DNA glicosilasi, che inibisce il meccanismo di riparazione *Base Excision Repair* (BER) mitocondriale (Fig. 2). Questa deaminasi è stata utilizzata in embrioni di topo per indurre mutazioni e creare dei modelli che potessero riprodurre malattie umane come MELAS o LHON, purtroppo senza manifestazioni fenotipiche probabilmente a causa di un livello eccessivamente limitato di eteroplasmia.

Questo approccio presenta diversi aspetti sfavorevoli: sono infatti stati riportati diversi casi di deaminazione nucleare e mitocondriale *off-target* e, a causa dei requisiti limitanti, la maggior parte delle mutazioni patogenetiche umane del mtDNA non può essere corretta da mitoDdCBE. Inoltre, il risultato dipende anche dal contesto e l'efficienza e gli effetti *off-target* sono prevalentemente determinati dall'orientamento della deaminasi divisa e dall'abbondanza delle coppie TC *off-target*. Versioni a più alta fedeltà di DddA<sub>tox</sub> e l'inserimento di un NES potrebbero rappresentare delle soluzioni per migliorare l'affidabilità del sistema.

L'editor di basi che invece opera una conversione A>G è denominato TALE. Il sistema possiede una possibile struttura monomerica e due dimeriche, tutte contenenti MTS, dominio di *binding* TALE e la proteina TadA-8e, adenina deaminasi ingegnerizzata da TadA di *E. coli*. Per ragioni non note, per ottenere un risultato migliore è anche necessario inserire un dominio DddA<sub>tox</sub> inattivo. Questo *editor* è stato testato in cellule umane, dove però non ha prodotto fenotipi mitocondriali, ma una mutazione che conferisce resistenza al cloramfenicolo, mutazione che tramite utilizzo di farmaci può essere anche portata in omoplasma.



**Fig. 2: mitoDdCBE**

L'architettura comprende una coppia di MTS-TALE collegati a una metà di DddAtox (DddA) e ad un inibitore dell'uracil glicosilasi (UGI). Questo strumento programmabile utilizza l'MTS di SOD2 e dell'unità 8 A della citocromo c ossidasi (Cox8A).

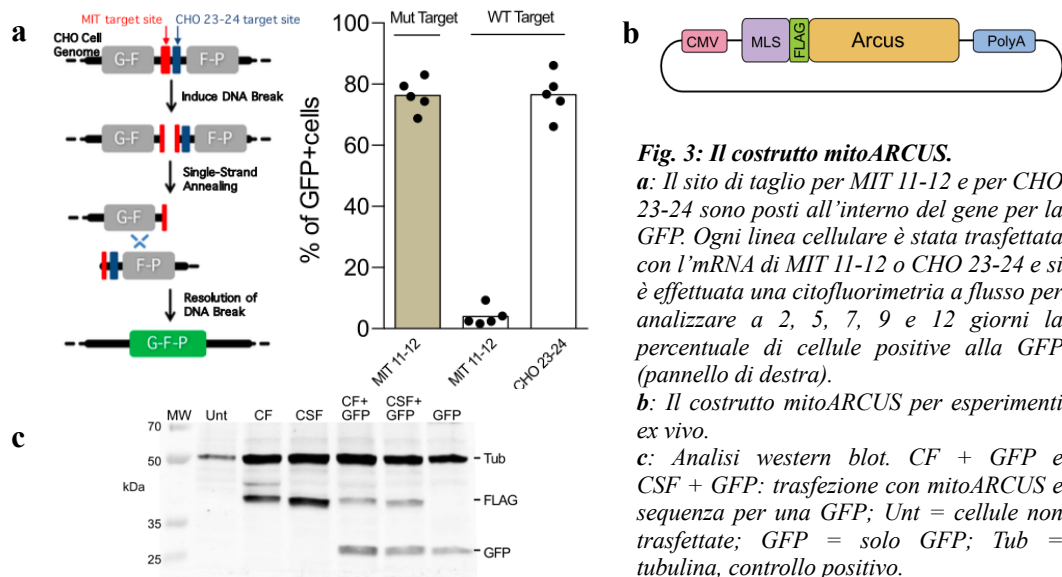
### 1.3.3 Approcci basati su acidi nucleici

Nella teoria gli acidi nucleici possono essere importati nei mitocondri tramite nanoparticelle, ma non è ancora presente alcuna documentazione a riguardo. Fino ad ora, dunque, le piattaforme proteiche rimangono la migliore alternativa [2].

## CAPITOLO 2: RISULTATI

### 2.1 Progettazione del vettore

La terapia genica testata nell'articolo in esame si basa sull'utilizzo di una mitoARCUS, enzima di *editing* descritto nel paragrafo 1.3.1. La mitoARCUS in questione, creata per la mutazione m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup>, ovvero la mutazione del genoma mitocondriale in posizione 5024 che prevede una timina al posto della citosina, è stata veicolata con un virus adeno-associato di sierotipo 9 (AAV9) in diversi tessuti murini ottenendo un buon risultato in termini di ripristino di livelli di tRNA<sup>Ala</sup> e di eliminazione di mtDNA mutato [1]. I virus adeno-associati sono virus che possono essere ingegnerizzati in modo da veicolare DNA all'interno di cellule ospiti: si tratta di virus senza *envelope* appartenenti alla famiglia dei Parvovirus, scoperti per la prima volta come contaminanti in preparati di adenovirus, dai quali infatti dipendono per replicare quando infettano una cellula [7]. La mitoARCUS in esame è definita MIT 11-12 e per verificarne l'efficacia sono state ingegnerizzate due linee di cellule di ovario di criceto (CHO) in modo che presentassero il sito target mitocondriale *wild-type* o mutato nel genoma nucleare. Il sito è stato posizionato all'interno di un gene codificante per una proteina verde fluorescente (GFP), in modo che tramite ricombinazione omologa data da DSB si potesse, se tagliato il sito, formare una proteina funzionante. È stato anche incorporato un sito di taglio per un'altra endonucleasi (CHO 23-24) che ha costituito un controllo positivo. Si è visto che la MIT 11-12 ha prodotto circa l'80% di cellule fluorescenti quando testata contro il sito target mutante e meno del 5% quando testata contro il sito *wild-type* (**Fig. 3a**). Sono stati progettati due costrutti genici per mitoARCUS per l'espressione *ex vivo*, il primo presentante una sequenza di localizzazione mitocondriale (MLS) Cox8 (definito costrutto CF), il secondo Cox8/Su9 (definito costrutto CSF) [1]. Cox8 è la subunità 8 del complesso IV della catena respiratoria [3], mentre con Su9 si fa riferimento alla subunità 9 della struttura F0 dell'ATPasi mitocondriale [8]. Entrambe le varianti contengono un promotore CMV, MLS (Cox8 o Cox8/Su9), una sequenza FLAG per l'immunoistochimica, la sequenza ARCUS della meganucleasi e una coda di poli(A) (**Fig. 3b**). Si è poi scelto il costrutto CSF per gli esperimenti successivi poiché, in analisi di western blot, non presentava bande spurie nelle cellule trasfettate (**Fig. 3c**).



**Fig. 3: Il costrutto mitoARCUS.**

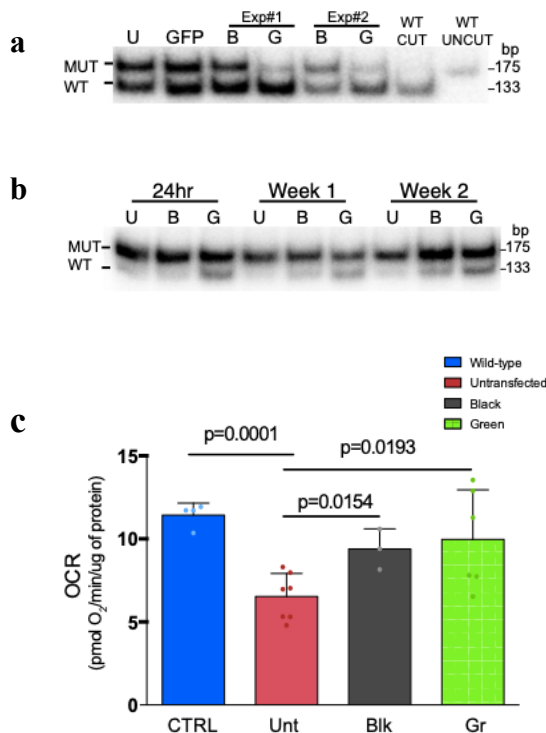
**a:** Il sito di taglio per MIT 11-12 e per CHO 23-24 sono posti all'interno del gene per la GFP. Ogni linea cellulare è stata trasfettata con l'mRNA di MIT 11-12 o CHO 23-24 e si è effettuata una citofluorimetria a flusso per analizzare a 2, 5, 7, 9 e 12 giorni la percentuale di cellule positive alla GFP (pannello di destra).

**b:** Il costrutto mitoARCUS per esperimenti *ex vivo*.

**c:** Analisi western blot. CF + GFP e CSF + GFP: trasfezione con mitoARCUS e sequenza per una GFP; Unt = cellule non trasfettate; GFP = solo GFP; Tub = tubulina, controllo positivo.

## 2.2 Test in cellule in coltura

L'efficienza della mitoARCUS è stata testata in fibroblasti di embrioni di topo (MEF) con il 50% dei mitocondri affetti dalla mutazione m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup>. Insieme al plasmide esprimente la mitoARCUS ne è stato anche inserito uno esprimente GFP in rapporto 2 mitoARCUS : 1 GFP. Dopo la trasfezione, le cellule positive alla GFP risultavano l'11-20% delle cellule totali. Le cellule sono state divise in "Black" (cellule non trasfettate) e "Green" (cellule verdi, trasfettate). Tramite PCR/RFLP sono stati identificati i livelli di eteroplasmia nelle due popolazioni in due esperimenti indipendenti, constatando che nella popolazione "Green" era avvenuto un forte spostamento di eteroplasmia (50-60%), nella popolazione trasfettata solo con il plasmide GFP non erano avvenuti cambiamenti e nella popolazione "Black" l'eteroplasmia aveva comunque subito un piccolo spostamento (10-20%) probabilmente a causa dell'incorporazione del plasmide mitoARCUS ma non del plasmide GFP (Fig. 4a). Si è utilizzata successivamente una linea MEF con livello di eteroplasmia pari al 90% e si è analizzato il mtDNA a 1, 7, 14 e 21 giorni post trasfezione sempre tramite PCR/RFLP (Fig. 4b). La popolazione di cellule positive alla GFP è risultata essere sempre l'11-20% delle cellule totali e queste cellule hanno mostrato già dopo 24 ore uno spostamento di eteroplasmia del 25%, risultato che si è mantenuto per 2 settimane. Sempre nella popolazione "Green" si è osservato, oltre ad una deplezione di mtDNA totale a 24 ore dalla trasfezione ripristinata dopo 21 giorni, anche un aumento del tasso di consumo di ossigeno (OCR) [1]: la misurazione della respirazione può essere infatti utile per valutare l'alterazione dell'attività di specifici enzimi o nodi metabolici [9]. Anche nelle cellule "Black", per lo stesso motivo descritto per il caso precedente, si è osservata una lieve diminuzione di eteroplasmia ed un lieve incremento di OCR (Fig. 4c).



**Fig. 4: Effetti di mitoARCUS su cellule eteroplasmiche per la mutazione m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup>.**

**a:** Analisi RFLP-HOT PCR in due esperimenti di trasfezione in cellule eteroplasmiche al 50% per la mutazione in esame. I livelli di mutanti nelle popolazioni di cellule verdi (G) sono stati confrontati con quelli delle cellule non trasfettate (U). Questo esperimento è stato eseguito una volta.

**b:** Analisi RFLP "last cycle hot" PCR in diversi momenti in cellule con livello di eteroplasmia 90% trasfettate con mitoARCUS. Questo esperimento è stato effettuato 3 volte con esiti simili.

**c:** Il tasso di consumo di ossigeno (OCR) è stato dedotto in cellule con alti livelli di eteroplasmia, trasfettate con mitoARCUS e coltivate per 3 settimane [n = 3 (CTRL), n = 7 (Unt), n = 3 (Blk), n = 7 (Gr)]. I dati sono medi ± SEM. L'analisi è stata eseguita utilizzando il t-test di Student a due code.

### 2.3 Test *in vivo*

MitoARCUS è stata clonata in particelle virali AAV9 per le applicazioni *in vivo*; AAV9-mitoARCUS è stato iniettato per via retro-orbitale in un gruppo di topi eteroplasmici per la mutazione m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup> e come controllo si è adoperato un costrutto AAV9-GFP in un altro gruppo di topi eteroplasmici, con livelli di eteroplasma per entrambi i gruppi intorno a 50-80%. Sono state effettuate le iniezioni in topi giovani (2.5 settimane) e topi adulti (6 settimane), per verificare gli effetti della terapia a diverse età: un topo di 2.5 settimane modella infatti un bambino di 2 anni, mentre i topi di 6 settimane sono paragonabili ad un ragazzo di 20 anni circa; a 6, 12 e 24 settimane post iniezione (PI) i topi sono stati sacrificati e si sono collezionati cuore, muscolo tibiale anteriore (TA), quadricipite, gastrocnemio, rene, fegato, cervello e milza per le opportune analisi. Sono stati anche sacrificati topi di 2.5 settimane a 5 e 10 giorni PI per studiare gli effetti immediati dell'iniezione.

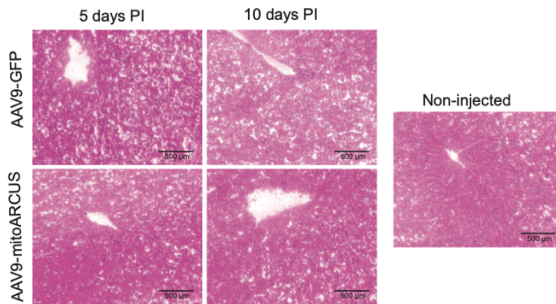
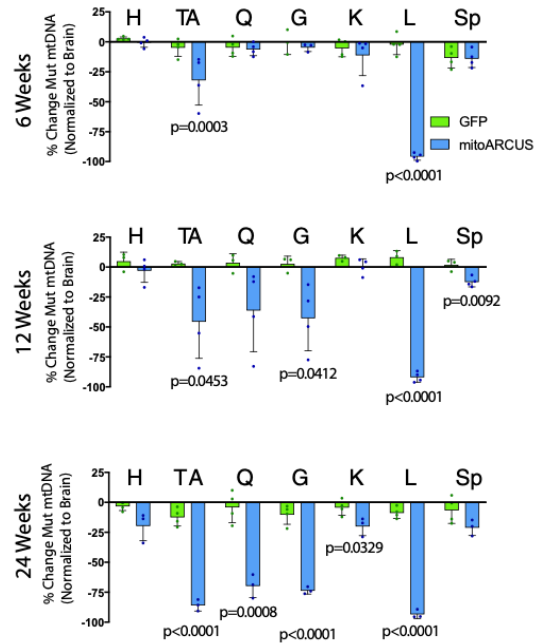
#### 2.3.1 Test in topi giovani

I topi di 2.5 settimane che hanno subito l'iniezione di AAV9-mitoARCUS hanno mostrato alta espressione di mitoARCUS nel cuore, muscoli scheletrici e in qualche caso nel fegato a 6, 12 e 24 settimane. Invece gli animali che hanno subito l'iniezione di AAV9-GFP hanno mostrato espressione più alta nel fegato a 6 e 12 settimane PI. Tramite analisi RFLP, nei topi trattati con mitoARCUS si è confermata la riduzione di mtDNA mutato in fegato e TA a 6 settimane, mentre a 24 la riduzione ha coinvolto mtDNA mutato anche in cuore, muscoli scheletrici e rene (**Fig. 5**); i topi trattati con AAV9-GFP hanno mostrato livelli simili di mutazione in tutti i tessuti dopo l'iniezione. Il cervello è stato utilizzato come controllo negativo poiché in questo organo non si sono notati cambiamenti nei livelli di eteroplasma, né con iniezione di AAV9-mitoARCUS né di AAV9-GFP. Si è positivamente notato che non si è verificata una deplezione di mtDNA nei tessuti in analisi e che i topi non hanno subito perdita di peso. Nonostante la riduzione di eteroplasma, non si è verificata una chiara espressione di mitoARCUS nel fegato a 6, 12 e 24 settimane PI: gli autori dell'articolo hanno quindi deciso di sacrificare i topi a 5 e 10 giorni PI e hanno rilevato espressione della mitoARCUS solo nel fegato – mentre GFP era visibile anche in cuore e muscoli scheletrici – notando un cambiamento di eteroplasma solo nei tessuti epatici, con una riduzione di mtDNA mutato del 22% a 5 giorni PI e del 55% a 10 giorni PI, percentuale in aumento data dal rimpiazzo maggiore di mtDNA *wild-type* con il passare dei giorni. Gli autori hanno quindi analizzato l'espressione dell'antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA, *marker* di rigenerazione epatica), della Caspasi-3 e della *cleaved* Caspasi-3 nel fegato per studiare un eventuale ruolo dell'apoptosi: non si sono rilevate differenze tra gli animali trattati con mitoARCUS e i controlli né a 5 né a 10 giorni PI. Inoltre, allo scadere di tali termini non si è riscontrata deplezione di mtDNA totale. Con una colorazione ematossilina-eosina si è anche potuto osservare che la morfologia del fegato degli animali trattati e dei controlli non differisce (**Fig. 6**). Si è infine escluso un possibile *editing* nucleare di mitoARCUS: si è operato un sequenziamento dei siti identificati da un saggio *off-target in vitro* esteso a tutto il genoma e il DNA di TA e fegato dei topi giovani è stato analizzato mediante sequenziamento mirato di ampliconi, tecnica in grado di rilevare variazioni come inserzioni e delezioni: nel caso dei DNA in esame non sono state individuate inserzioni o delezioni per alcun animale, si sarebbero invece rilevate se

ci fossero stati tagli *off-target* nucleari a causa del meccanismo di riparazione di tagli a doppio filamento (assente nei mitocondri).

**Fig. 5: Effetti di AAV9-mitoARCUS in topi giovani.**

Quantificazione dello spostamento di eteroplasmia rappresentato come percentuale di cambiamento di eteroplasmia in tutti i tessuti a 6, 12 e 24 settimane PI. Le lettere indicano i diversi organi presi in considerazione: cuore (H), quadricipite (Q), gastrocnemio (G), rene (K), fegato (L) e milza (Sp).

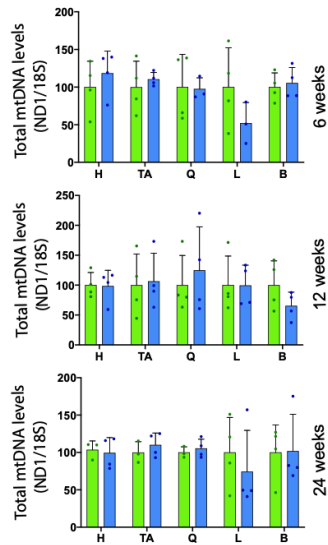


**Fig. 6: Istologia del fegato a 5 e 10 giorni PI.**

I campioni di fegato sono stati incorporati in OCT (matrice crio-imprimante per l'inclusione dei tessuti a freddo) e congelati rapidamente (snap freezing). I campioni sono stati tagliati a 7μm di spessore e colorati con E&E. Questo esperimento è stato ripetuto due volte ottenendo gli stessi risultati.

### 2.3.2 Test in topi adulti

Il trattamento con AAV9-mitoARCUS è stato effettuato anche in topi di 6 settimane, sempre eteroplasmici per la mutazione m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup>. Nonostante l'età sia meno permissiva, si è notata una forte espressione del costrutto in cuore e fegato, mentre nei muscoli scheletrici l'espressione era più debole. Gli animali trattati con AAV9-GFP hanno mostrato buona espressione di GFP in cuore, TA e fegato ed espressione minore in quadricipite e gastrocnemio. Tramite analisi RFLP si è osservata un'eliminazione quasi totale di mtDNA mutato nel fegato a 6 settimane PI negli animali trattati con mitoARCUS, risultato che ha persistito nel tempo. Anche in altri tessuti si è notata una riduzione di mtDNA mutato (TA e gastrocnemio a 24 settimane PI), ma al di sotto della significatività statistica. Anche in questo caso, i topi che hanno subito l'iniezione di AAV9-GFP non hanno mostrato una riduzione di eteroplasmia e il cervello è stato utilizzato per normalizzare le variazioni. Il livello totale di mtDNA ha subito una lieve diminuzione nel fegato degli animali trattati con AAV9-mitoARCUS a 6 settimane PI ma non a 12 né a 24 (Fig. 7).

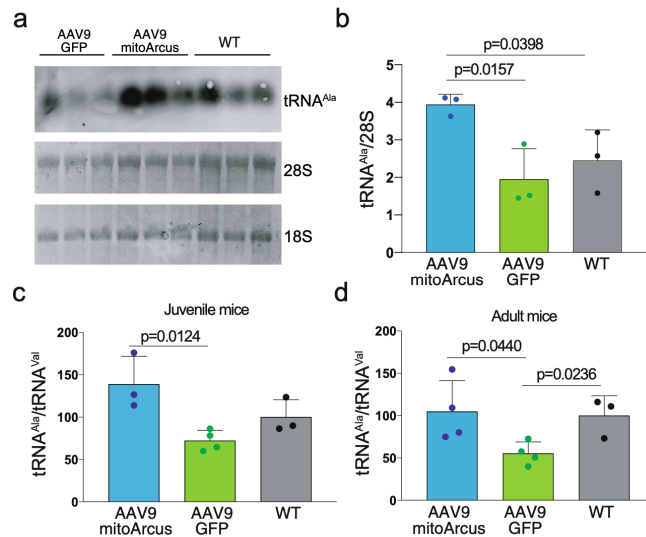


**Fig. 7: Effetti di AAV9-mitoARCUS in topi adulti.**

Quantificazione di mtDNA totale tramite qPCR in cuore, TA, quadricipite, fegato e cervello (B) effettuata utilizzando i primer/sonde mitocondriali ND1 e ND5 normalizzati per 18S (DNA nucleare). I dati sono medi  $\pm$  SEM, n = 4.

## 2.4 Ripristino dei livelli di mt-tRNA<sup>Ala</sup>

Poiché nei tessuti con alto livello di mtDNA mutato i livelli di mt-tRNA<sup>Ala</sup> risultano ridotti, gli autori hanno effettuato due tipi di analisi per valutarne il possibile recupero: tramite analisi di northern blot si sono analizzati i livelli di mt-tRNA<sup>Ala</sup> negli animali trattati con AAV9-mitoARCUS confrontandoli con i controlli trattati con AAV9-GFP normalizzati per 28S rRNA (**Fig. 8a, b**), mentre mediante qPCR si è valutato il rapporto tra mt-tRNA<sup>Ala</sup> e mt-tRNA<sup>Val</sup>. Tramite quest'ultima tecnica si è osservato che gli animali trattati con AAV9-mitoARCUS presentano livelli di mt-tRNA<sup>Ala</sup> superiori rispetto ai controlli AAV9-GFP, affermazione valida per topi di 2.5 (**Fig. 8c**) e 6 (**Fig. 8d**) settimane [1].



**Fig. 8: mitoARCUS ha indotto un aumento di mt-tRNA<sup>Ala</sup> nel fegato.**

**a:** Analisi northern blot del fegato di topi giovani a 24 settimane PI: tRNA<sup>Ala</sup> e RNA totale (28S e 18S).

**b:** Quantificazione di mt-tRNA<sup>Ala</sup> dal pannello a normalizzata per rRNA 28S (n = 3).

**c:** Quantificazione di mt-tRNA<sup>Ala</sup> mediante qPCR confrontata con i livelli di mt-tRNA<sup>Val</sup> nel fegato di topi giovani 24 settimane PI. Campioni di RNA di animali trattati con AAV9-mitoARCUS confrontati con i controlli con AAV9-GFP e ai campioni di fegato wild-type (n = 3 con l'eccezione di GFP n = 4).

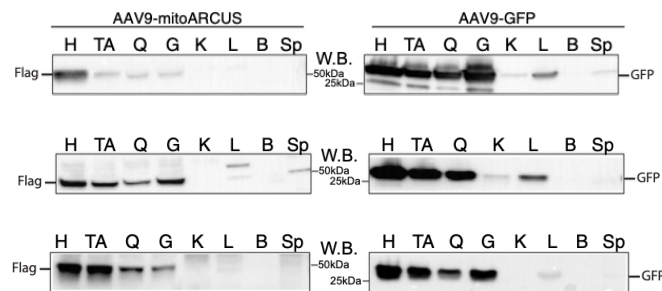
**d:** Quantificazione di mt-tRNA<sup>Ala</sup> rispetto ai livelli di mt-tRNA<sup>Val</sup> nel fegato di topi adulti. Campioni di RNA di animali trattati con AAV9-mitoARCUS confrontati con controlli AAV9-GFP e campioni di fegato WT, a 24 settimane PI (n = 4 con l'eccezione di WT n = 3). I dati sono medi  $\pm$  SEM. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test t di Student a due code.

## CAPITOLO 3: APPROCCIO SPERIMENTALE

### 3.1 Western blot

Il western blot è una tecnica immunochimica che si basa sull'utilizzo di anticorpi in grado di legare specificamente uno o più epitopi di una proteina, permettendone quindi la rilevazione in una miscela. Per eseguire un western blot sono previste diverse fasi, prima tra queste una separazione delle proteine tramite corsa elettroforetica. L'elettroforesi può essere eseguita in condizioni denaturanti per separare le proteine sulla base della loro dimensione oppure in condizioni native per separarle anche in base alla loro carica: una volta terminata la corsa, si opera un trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di nitrocellulosa o PVDF (polivinilidenefluoruro) grazie ad un campo elettrico con la membrana al polo positivo. Dopo il trasferimento la membrana viene saturata tramite un *blocking* con latte o albumina per coprire i siti aspecifici, impedendo così che l'anticorpo vi si leghi. Si procede poi con l'incubazione con l'anticorpo primario diretto contro la proteina di interesse: se questo anticorpo è già coniugato con un sistema di rilevazione è sufficiente una sola incubazione, seguita da lavaggio per eliminare tutto l'anticorpo che non si è legato; se invece l'anticorpo primario non possiede elementi rilevabili, dopo il lavaggio si effettua una seconda incubazione con un anticorpo secondario che sappia riconoscere le catene pesanti del primario e la membrana viene nuovamente lavata per eliminare l'anticorpo secondario che non si è legato. Infine, l'ultima fase del processo prevede la rilevazione del segnale, diretta o indiretta in base alla collocazione del tracciante sull'anticorpo primario o secondario. Grazie a questa fase è possibile rilevare la proteina target tramite metodiche colorimetriche, in fluorescenza o in luminescenza se l'anticorpo secondario è coniugato con perossidasi, enzima in grado di ossidare il luminolo in presenza di perossido di idrogeno liberando luce.

Gli autori dell'articolo si sono serviti di questa tecnica per rilevare le proteine prodotte dai costrutti CF e CSF durante la progettazione del vettore AAV9-mitoARCUS e per verificare l'espressione di mitoARCUS nei diversi organi analizzati quando si sono effettuati i test *in vivo* (**Fig. 9**): l'omogenato di tutte le proteine è stato preparato dai tessuti congelati e si sono fatti correre 40 µg di campione nei gel Mini-PROTEAN Stain-Free Protein Gels. Terminata la corsa si è effettuato il trasferimento delle proteine sulla membrana di PVDF usando il sistema TransBlot Turbo. Il *blocking* è stato effettuato con latte al 5%; sono stati adoperati anticorpi primari anti-FLAG e anti-GFP e anticorpo secondario coniugato con perossidasi [1].



**Fig. 9: Western blot degli omogenati in topi giovani.**

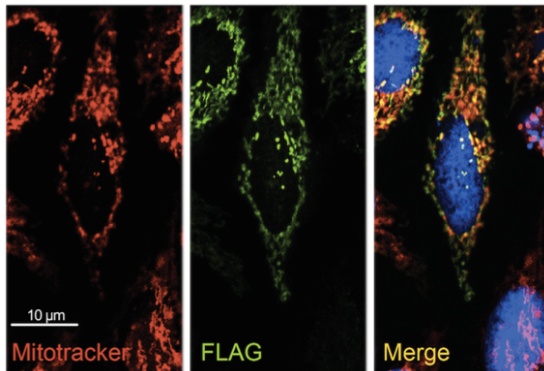
Sono stati utilizzati anticorpi anti-FLAG per gli animali trattati con AAV9-mitoARCUS, anti-GFP per quelli trattati con AAV9-GFP. Pannello superiore: 6 settimane PI; pannello centrale: 12 settimane PI; pannello inferiore: 24 settimane PI.



### 3.2 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica che permette di visualizzare prevalentemente proteine all'interno delle cellule sfruttando l'interazione antigene-anticorpo utilizzando anticorpi coniugati con fluorofori. È una tecnica definita semi-quantitativa, poiché fornisce informazioni qualitative riguardanti la localizzazione e la presenza o assenza dell'antigene all'interno della cellula, ma anche nozioni sulla sua quantità.

Nell'articolo viene utilizzata l'immunofluorescenza per confermare la localizzazione mitocondriale delle proteine prodotte dai costrutti CF e CSF: si è effettuata una trasfezione in cellule HeLa e si è visto che entrambi i costrutti erano in grado di produrre proteine localizzate nei mitocondri (**Fig. 10**). La trasfezione è durata 24 ore, le cellule sono poi state incubate per 1 ora a 37°C con MitoTracker Red CMXRos 200 nM e fissate con paraformaldeide al 2% per 15 minuti a temperatura ambiente. È stato eseguito il *blocking* per 1 ora con albumina di siero bovino (BSA) e successivamente le cellule sono state incubate per 1 ora con l'anticorpo primario anti-FLAG. Dopo il lavaggio gli autori hanno eseguito l'incubazione con l'anticorpo secondario. Sono stati lavati alcuni vetrini coprioggetto con PBS e montati su vetrini utilizzando un *mounting medium* contenente 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, importante colorante del nucleo). Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale [1].



**Fig. 10:** Espressione mitocondriale di *mitoARCUS*.

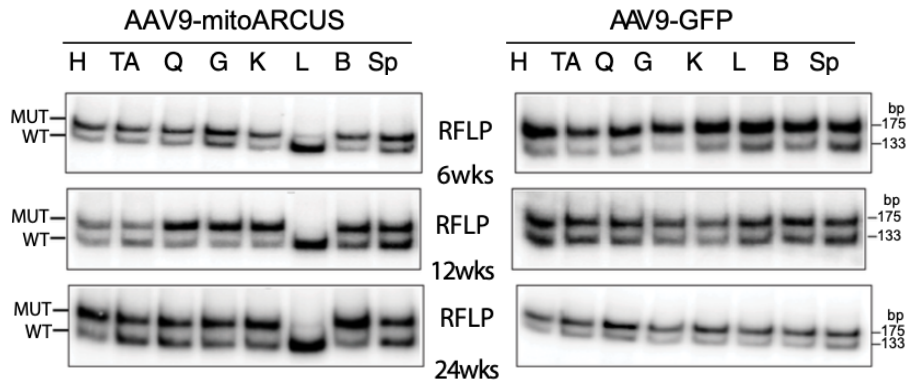
Immunofluorescenza eseguita su cellule HeLa 24 ore dopo la trasfezione con *mitoARCUS*. MitoTracker colora i mitocondri di rosso, FLAG colora *mitoARCUS* di verde e la terza immagine mostra la colocalizzazione (giallo) di *mitoARCUS* nei mitocondri. Immagini scattate con ingrandimento 40x. Questo esperimento è stato ripetuto due volte con risultati identici.

### 3.3 Estrazione del DNA, quantificazione e analisi RFLP

Il DNA totale è stato estratto dai tessuti congelati grazie all'utilizzo di fenolo cloroformio, reagente che permette la precipitazione di lipidi e proteine, facendo collocare le proteine denaturate nell'interfase e facendo rimanere DNA e RNA nella fase acquosa; dalle cellule è invece stato estratto usando il kit NucleoSpin Tissue XS. È stata poi determinata la concentrazione di DNA tramite spettrofotometria. I livelli della mutazione m.5024C>T sono stati determinati tramite una PCR detta "*last-cycle hot*", tecnica che prevede l'utilizzo di nucleotidi marcati radioattivamente nell'ultimo ciclo di reazione grazie ai quali viene eliminata l'interferenza degli eteroduplex formati dalle fusioni ed *annealing* precedenti, visualizzando in questo modo solo gli ampliconi nascenti.

È stata poi effettuata un'analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) digerendo gli ampliconi ottenuti con l'enzima di restrizione PstI-HF, capace di digerire il mtDNA *wild-type*, ma non quello mutato. I prodotti della digestione enzimatica sono stati fatti correre in un gel di poliaccrilammide al 12%, potendo così

visualizzare le bande dei campioni di DNA *wild-type* e di DNA mutato, rispettivamente 175 pb e 133 pb (**Fig. 11**) [1].



**Fig. 11: Analisi RFLP in topi adulti.**  
Analisi PCR last-cycle hot/RFLP di campioni di DNA a 6, 12 e 24 settimane post iniezione.

### 3.4 Colorazione ematossilina eosina

La colorazione ematossilina eosina è una delle più comuni colorazioni istologiche e permette di visualizzare le diverse componenti cellulari in microscopia ottica. L'ematossilina è un colorante basico di origine vegetale, in grado di colorare di blu/viola i componenti cellulari carichi negativamente (basofili) come acidi nucleici e proteine di membrana; l'eosina, invece, è un derivato della fluoresceina e si tratta di un colorante acido, che colora di rosso/rosa tutte le parti della cellula cariche positivamente (acidofile) come proteine cellulari, mitocondriali e le fibre collagene. Questa colorazione è stata effettuata su campioni di fegato di topi di 2.5 settimane per valutare l'eventuale cambiamento di morfologia conseguente al trattamento con AAV9-mitoARCUS [1].

### 3.5 Rilevamento di tagli *off-target* nucleari

Per il rilevamento di eventuali siti di taglio nucleari è stato eseguito un saggio noto come "*oligo capture*", che consiste in una modifica di GUIDE-seq più sensibile nel rilevare i DSB indotti da ARCUS. GUIDE-seq è una tecnica che permette di incorporare oligondeossinucleotidi nei DSB indotti dalle nucleasi. Questi siti di integrazione vengono poi precisamente mappati a livello nucleotidico usando metodi di sequenziamento di nuova generazione [10].

Nell'articolo in esame, le cellule di topo FL83B sono state elettroporate con mitoARCUS e analizzate mediante *oligo capture* 2 giorni dopo la trasformazione. Sono state identificate grazie a questa tecnica cinque sequenze genomiche nucleari come siti putativi *off-target* per questa nucleasi: campioni di DNA da topi eteroplasmici trattati con mitoARCUS sono stati quindi analizzati per cercare la presenza o assenza di inserzioni e delezioni in queste regioni genomiche nucleari [1].

### 3.6 Northern blot

L'RNA è stato isolato dai tessuti congelati con TRIzol, si sono poi trattati i campioni con DNasi prima di procedere con la quantificazione spettrofotometrica.

L'analisi northern blot permette di visualizzare e identificare l'RNA purificato da un campione ed è utilizzata per studiare l'espressione di uno o più geni. Per l'analisi di northern blot proposta nell'articolo in esame, si sono fatti correre 4 µg di RNA epatico totale per campione in gel di agarosio all'1.2% contenente formaldeide e acido 3-morfolinopropano-1-solfonico (MOPS). Gli agenti denaturanti sono importanti nella corsa elettroforetica dell'RNA perché questo acido nucleico tende a formare strutture secondarie, che se non linearizzate falsificherebbero il risultato finale dell'elettroforesi. Sono quindi di fondamentale importanza la denaturazione prima della corsa elettroforetica e gli agenti denaturanti durante la corsa che mantengono l'RNA lineare.

Nell'articolo il gel è stato colorato con bromuro di etidio (EtBr) per la visualizzazione e lavato poi per due volte per rimuovere l'EtBr. L'RNA è stato trasferito durante la notte su una membrana di nylon e i trascritti di interesse sono stati rilevati con sonde biotiniche non radioattive. Il giorno successivo la membrana è stata lavata per eliminare le sonde che non si sono legate ad alcun frammento e il segnale è stato rilevato tramite l'utilizzo di streptavidina, che si appaia alla biotina delle sonde. Gli autori hanno utilizzato una sonda biotinilata per rilevare il mt-tRNA<sup>Ala</sup>, notando un aumento di questo tRNA in animali trattati con AAV9-mitoARCUS rispetto ai controlli trattati con AAV9-GFP [1].

### 3.7 Real time PCR

La Real time PCR (o *quantitative* PCR, qPCR) è una tecnica di biologia molecolare che viene utilizzata per amplificare (grazie alla reazione a catena della polimerasi, PCR) e quantificare simultaneamente la quantità di DNA o RNA, che dev'essere retroscritto in cDNA a doppio filamento. È definita "*real time*" perché rispetto alla normale PCR permette di monitorare in tempo reale la quantità di amplicone, grazie all'utilizzo di un fluoroforo (*SYBR green*) che si lega quantitativamente al DNA: ad ogni ciclo di PCR il segnale dato dal fluoroforo aumenterà grazie all'amplificazione e il primo ciclo che ne permetterà la visualizzazione sarà detto "ciclo soglia" (Ct, *threshold cycle*). La quantità di cicli necessari per arrivare al ciclo soglia dipenderà dalla quantità di template iniziale presente nel campione: maggiore è la quantità di template, meno cicli di PCR saranno necessari perché la fluorescenza diventi rilevabile, il valore di Ct risulterà quindi minore. La Real time PCR si può usare per la quantificazione assoluta di un determinato template ma anche per rilevare l'espressione relativa di due trascritti in diversi campioni confrontando i rispettivi Ct.

Questa tecnica è stata utilizzata dagli autori dell'articolo per determinare i livelli totali di mtDNA comparandolo con il DNA genomico, ma anche per determinare il rapporto tra mt-tRNA<sup>Ala</sup> e mt-tRNA<sup>Val</sup>, notando sia in topi giovani sia in topi adulti un livello di mt-tRNA<sup>Ala</sup> maggiore nei topi trattati con AAV9-mitoARCUS rispetto ai topi di controllo AAV9-GFP [1].

## CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Al momento attuale la maggior parte delle cure per le malattie mitocondriali consiste in trattamenti palliativi, ma l'approccio proposto nell'articolo, ovvero lo spostamento del livello di eteroplasmia del mtDNA, rappresenta un approccio terapeutico interessante per i disturbi mitocondriali eteroplasmici gravi: diminuendo infatti i livelli di mtDNA mutato al di sotto della soglia della malattia i fenotipi possono subire un miglioramento.

MitoARCUS è in grado di superare i problemi di mtZFNs e mitoTALENs in termini di ingombro ed impacchettamento in vettori virali: a differenza di queste due nucleasi, infatti, può essere inserita in un unico vettore virale ed essere iniettata in dosi maggiori. L'endonucleasi testata dagli autori ha permesso uno spostamento di eteroplasmia fino al 60% in cellule in coltura dopo 24 ore, riduzione rimasta consistente per 3 settimane: questo spostamento è stato sufficiente per poter osservare una netta ripresa del funzionamento mitocondriale nelle cellule trattate, ad esempio tramite l'innalzamento di OCR, ma anche un cambiamento biochimico dato l'innalzamento dei livelli di mt-rRNA<sup>Ala</sup>. Un altro punto a favore della terapia proposta consiste nel recupero dei livelli di mtDNA totali: nonostante la deplezione osservata a 24 ore dal trattamento, dopo 3 settimane grazie alla replicazione delle molecole di mtDNA residue i livelli di mtDNA sono tornati normali. Questo rapido recupero non può far escludere che mitoARCUS non abbia tagliato qualche mtDNA *wild-type*, ma può indicare che è abbastanza specifica da promuovere una robusta eliminazione del mtDNA mutante. Anche nei test *in vivo* AAV9-mitoARCUS ha avuto successo nello spostamento di eteroplasmia e nel mantenimento dei livelli di mtDNA: la riduzione maggiore di mtDNA mutato si è osservata in topi giovani, poiché in possesso di un sistema immunitario maggiormente ricettivo alla terapia. Ai topi giovani è inoltre stato iniettato un titolo virale di 1.5 volte maggiore rispetto ai modelli adulti, quindi anche la quantità di vettore iniettata potrebbe giocare un ruolo importante.

I migliori risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati in topi di 2.5 settimane (che modellizzano bambini di circa 2 anni) suggeriscono che la terapia potrebbe essere più efficace in pazienti più giovani. Regolando finemente le dosi di AAV9-mitoARCUS si potrebbe inoltre prevenire la deplezione del mtDNA inducendo comunque una sufficiente riduzione di eteroplasmia.

Il mtDNA mutato nel fegato è stato quasi completamente eliminato a 6 settimane PI di AAV9-mitoARCUS, ma l'espressione di mitoARCUS in questo organo a questo punto temporale era piuttosto bassa: questo fenomeno è spiegabile dall'elevato epatotropismo di AAV9, che spiega l'immediata trasduzione di AAV9-mitoARCUS e lo spostamento di eteroplasmia verso quasi tutto mtDNA *wild-type*. Inoltre, poiché il fegato è un tessuto altamente attivo metabolicamente, AAV9 potrebbe essere stato eliminato prima delle 6 settimane, mentre altri tessuti come il muscolo scheletrico hanno mantenuto l'espressione di AAV9-mitoARCUS fino a 24 settimane PI. L'ipotesi è infatti confermata dalle analisi degli animali a 5 e 10 giorni PI, tramite le quali si è notata forte espressione del costrutto nel fegato ma non altrove. Nonostante AAV9 presenti tropismo elevato per diversi tessuti, come analizzato nel capitolo 2 non si è notata espressione nel sistema nervoso centrale. Nel cuore invece ne è stata rilevata l'espressione, ma l'effetto sulla riduzione di eteroplasmia è risultato ridotto. L'interesse per nuovi sierotipi di AAV e la loro specificità tissutale è negli ultimi anni decisamente cresciuto, poiché il *background*

genetico dei topi influenza in buona misura l'efficacia e specificità della trasduzione: si spera quindi che nuovi ceppi di AAV ingegnerizzati e promotori specifici per i diversi tessuti possano abbattere queste problematiche.



In conclusione, la struttura monomerica di mitoARCUS, la sua capacità di riconoscere nuove sequenze bersaglio ed il fatto che possa operare importanti spostamenti di eteroplasmia con minime controindicazioni rendono questa nucleasi un promettente strumento di eliminazione di mtDNA mutato che potrebbe essere ulteriormente sviluppato per applicazioni *in vivo* [1].

## BIBLIOGRAFIA

1. Zekonyte U, Bacman SR, Smith J, Shoop W, Pereira CV, Tomberlin G, Stewart J, Jantz D, Moraes CT. Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA in vivo. *Nat Commun.* 2021 May 28;12(1):3210. doi: 10.1038/s41467-021-23561-7. PMID: 34050192; PMCID: PMC8163834.
2. Barrera-Paez JD, Moraes CT. Mitochondrial genome engineering coming-of-age. *Trends Genet.* 2022 Aug;38(8):869-880. doi: 10.1016/j.tig.2022.04.011. Epub 2022 May 19. Erratum in: *Trends Genet.* 2023 Jan;39(1):89. doi: 10.1016/j.tig.2022.08.002. PMID: 35599021; PMCID: PMC9283244.
3. Silva-Pinheiro P, Minczuk M. The potential of mitochondrial genome engineering. *Nat Rev Genet.* 2022 Apr;23(4):199-214. doi: 10.1038/s41576-021-00432-x. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34857922.
4. Pereira CV, Moraes CT. Current strategies towards therapeutic manipulation of mtDNA heteroplasmy. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017 Jan 1;22(6):991-1010. doi: 10.2741/4529. PMID: 27814659; PMCID: PMC6986768.
5. Wah DA, Hirsch JA, Dorner LF, Schildkraut I, Aggarwal AK. Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature.* 1997 Jul 3;388(6637):97-100. doi: 10.1038/40446. PMID: 9214510.
6. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013 Jul;31(7):397-405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004. Epub 2013 May 9. PMID: 23664777; PMCID: PMC3694601.
7. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017 Aug;31(4):317-334. doi: 10.1007/s40259-017-0234-5. PMID: 28669112; PMCID: PMC5548848.
8. Stoltz M, Rassow J, Bückmann AF, Brandsch R. Covalent attachment of FAD derivatives to a fusion protein consisting of 6-hydroxy-D-nicotine oxidase and a mitochondrial presequence. Folding, enzyme activity, and import of the modified protein into yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 1996 Oct 11;271(41):25208-12. doi: 10.1074/jbc.271.41.25208. PMID: 8810280.
9. Divakaruni AS, Jastroch M. A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements. *Nat Metab.* 2022 Aug;4(8):978-994. doi: 10.1038/s42255-022-00619-4. Epub 2022 Aug 15. PMID: 35971004; PMCID: PMC9618452.
10. Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, Aryee MJ, Joung JK. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015 Feb;33(2):187-197. doi: 10.1038/nbt.3117. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25513782; PMCID: PMC4320685.



# Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA in vivo

Ugne Zekonyte<sup>1</sup>, Sandra R. Bacman<sup>2</sup>, Jeff Smith<sup>3</sup>, Wendy Shoop<sup>3</sup>, Claudia V. Pereira<sup>2</sup>, Ginger Tomberlin<sup>3</sup>, James Stewart<sup>4,5</sup> , Derek Jantz<sup>3</sup> & Carlos T. Moraes<sup>2</sup> 

Diseases caused by heteroplasmic mitochondrial DNA mutations have no effective treatment or cure. In recent years, DNA editing enzymes were tested as tools to eliminate mutant mtDNA in heteroplasmic cells and tissues. Mitochondrial-targeted restriction endonucleases, ZFNs, and TALENs have been successful in shifting mtDNA heteroplasmy, but they all have drawbacks as gene therapy reagents, including: large size, heterodimeric nature, inability to distinguish single base changes, or low flexibility and effectiveness. Here we report the adaptation of a gene editing platform based on the *I-CreI* meganuclease known as ARCUS<sup>®</sup>. These mitochondrial-targeted meganucleases (mitoARCUS) have a relatively small size, are monomeric, and can recognize sequences differing by as little as one base pair. We show the development of a mitoARCUS specific for the mouse m.5024C>T mutation in the mt-tRNA<sup>Ala</sup> gene and its delivery to mice intravenously using AAV9 as a vector. Liver and skeletal muscle show robust elimination of mutant mtDNA with concomitant restoration of mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels. We conclude that mitoARCUS is a potential powerful tool for the elimination of mutant mtDNA.

<sup>1</sup>Graduate Program Human Genetics and Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA. <sup>2</sup>Department of Neurology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA. <sup>3</sup>Precision BioSciences, Durham, NC, USA. <sup>4</sup>Faculty of Medical Sciences, Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK. <sup>5</sup>Wellcome Centre for Mitochondrial Research, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK. ✉email: [CMoraes@med.miami.edu](mailto:CMoraes@med.miami.edu)



**M**itochondrial DNA (mtDNA) is a small 16.5 kb circular molecule that encodes for 37 genes: 13 subunits of the oxidative phosphorylation system, as well as the 22 transfer RNA (tRNA)'s and 2 ribosomal RNA's needed for mitochondrial translation<sup>1</sup>. On average, human cells contain ~1000 mtDNA molecules<sup>2</sup>. Mutant and wild-type (WT) mtDNA molecules can co-exist within the cell, a phenomenon called mtDNA heteroplasmy. Specific threshold levels of mutant mtDNA need to be reached, to compromise cell function and for disease to manifest<sup>2</sup>. This is also an important aspect in mtDNA gene therapies, as not all mutant mtDNA need to be eliminated to see improvements in symptoms.

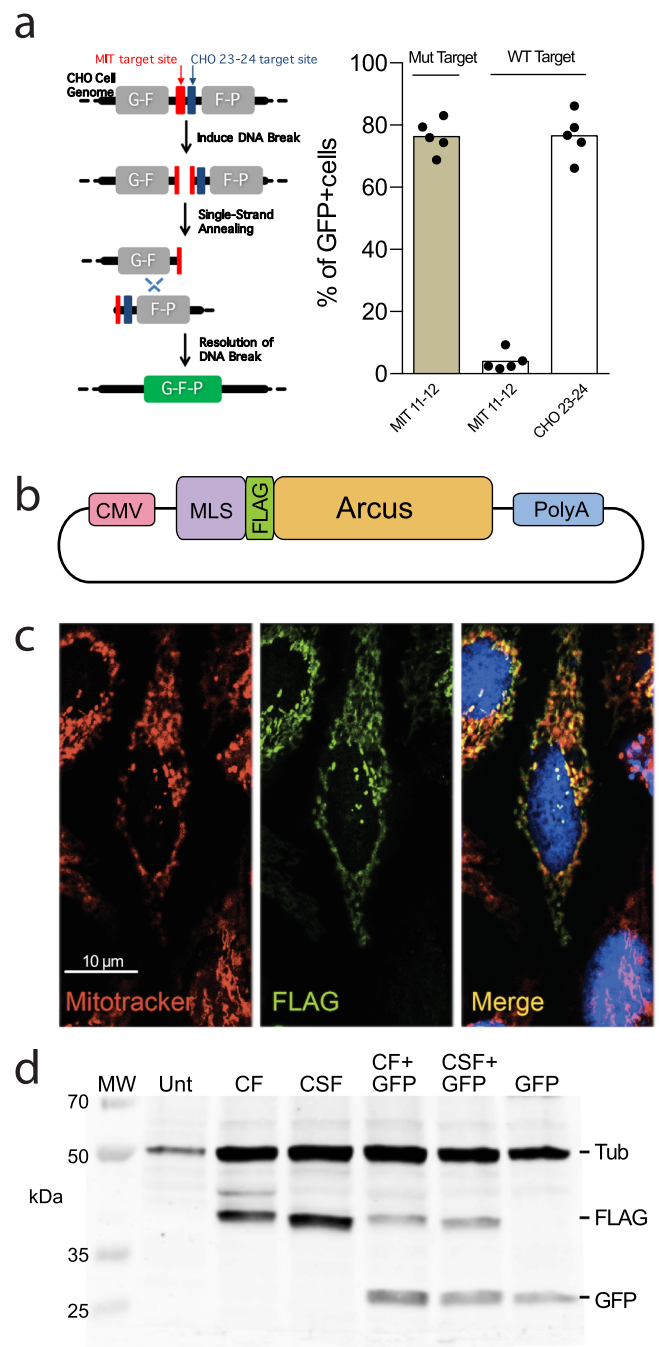
The prevalence of mtDNA diseases in the population has been estimated at 1 : 5000 individuals<sup>3</sup>. To date, over 250 pathogenic mutations in mtDNA have been identified<sup>4</sup>. MtDNA diseases are multi-systemic disorders that present very heterogeneous symptoms, even in patients carrying the same mutation, including but not limited to optic atrophy, stroke-like episodes, cardiomyopathies, muscle weakness, and neurodegeneration. However, essentially any organ in the body can be affected<sup>5</sup>.

Current mtDNA gene therapy developments take advantage of the mitochondria's lack of double-stranded break (DSB) repair mechanism. After mtDNA is cleaved and linearized, it is quickly degraded in the cell, followed by repopulation of mtDNA to original levels by replicating residual mtDNA<sup>6</sup>. We and others have used restriction endonucleases<sup>7–12</sup>, zinc finger nucleases (mitoZFNs)<sup>13–16</sup>, transcription activator-like effector nucleases (mitoTALENs)<sup>17–20</sup>, and mitoTev-TALE<sup>21</sup> to cleave and eliminate mutant mtDNA.

The ARCUS gene-editing platform, developed by scientists at Precision BioSciences, is based on the homing endonuclease *I-CreI*, which comes from the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genome, and is part of the LAGLIDADG motif meganuclease family<sup>22</sup>. *I-CreI* is a homodimeric enzyme that associates with a palindromic 22 bp double-stranded DNA sequence, where it produces a DSB<sup>23</sup>. Previously, these naturally homodimeric enzymes were engineered into monomers by using a peptide linker. In silico and directed evolution allowed the targeting of almost any DNA sequence<sup>24–27</sup>. These meganucleases' small size (1092 bp/40 kDa), monomeric nature, and specificity<sup>24–27</sup> make them particularly promising for mtDNA editing. Here we designed a mitoARCUS specific to the m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup> mutation, which was delivered with an adeno-associated virus (AAV9), to target to a wide range of tissues, including the skeletal muscle, heart, and liver<sup>28</sup>, resulting in a specific elimination of mtDNA and normalization of mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels.

## Results

**Designing a mitoARCUS against the m.5024C>T sequence in the mtDNA-encoded mt-tRNA<sup>Ala</sup> gene.** Using Precision BioSciences' protein engineering pipeline, a candidate meganuclease recognizing the mutated (m.5024C>T) mouse mtDNA sequence [5'-ATAAGGATTTGTAAGACTTCATC-3'] was produced. Analysis of the designer nuclease using a green fluorescent protein (GFP)-based DSB recombination assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells showed that the specific ARCUS nuclease (termed MIT 11-12) yielded ~80% GFP+ cells when tested against the intended (mutant) target sites but <5% GFP+ cells when tested against the WT target sites (Fig. 1a). For ex vivo expression, two variants were designed, CF and CSF, which differed by the mitochondrial localization sequence (MLS). We added either a Cox8<sup>29</sup> (construct CF) or a Cox8/Su9<sup>20,21</sup> (construct CSF) MLS to the N terminus. We also added a FLAG tag between the MLS and the meganuclease (Fig. 1b). Transient transfection in HeLa cells showed that both mitoARCUS constructs made proteins that



localized to mitochondria (Fig. 1c shows a representative cell for the CSF construct). A western blot confirmed that both CF and CSF constructs expressed the expected size proteins, after transfection of HEK293T cells (Fig. 1d). As the pattern in the western blot showed no spurious bands in the CSF-transfected cells, we chose the CSF variant for the subsequent experiments.

**MitoARCUS effectively shifted mtDNA heteroplasmy in cultured cells.** The efficiency of the mitoARCUS was first tested in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from a heteroplasmic mouse model carrying the mtDNA m.5024C>T mutation<sup>20</sup>. Experiments were conducted in cells carrying 50% of m.5024C>T mutation. As transfection efficiency was relatively low, we co-transfected a mitoARCUS-expressing plasmid with a plasmid expressing GFP (2 mitoARCUS:1 GFP ratio). GFP-positive cells comprised 11–20% of the total cell population after

**Fig. 1 mitoARCUS construct and mitochondrial expression.** **a** For an MIT nuclease (against the mouse mtDNA tRNA-Ala mutation [MIT 11–12]), a pair of engineered CHO lines were produced to carry either the wild-type (WT) or mutant mtDNA target site in the nuclear DNA. The target site was positioned between direct repeats of a GFP gene such that cleavage of the target site promotes homologous recombination events between repeated regions to yield a functional GFP. In addition, there is a target site for a positive control nuclease (“CHO 23–24”) incorporated next to the MIT target site (left panel). Each of the cell lines was transfected with mRNA encoding MIT 11–12 or CHO 23–24 (control) and cells were assayed by flow cytometry 2, 5, 7, 9, and 12 days post transfection for the percentage of GFP+ cells (the average GFP fluorescence for the different time points is shown in the right panel). As the different time points are not biological replicates, no statistic was applied. **b** mitoARCUS gene construct for ex vivo expression includes CMV promoter, mitochondrial localization sequence (MLS) of Cox8 or Cox8/Su9, Flag tag for immunological detection, Meganuclease (ARCUS) sequence, and PolyA tail. **c** Immunofluorescence done on HeLa cells 24 h after transfection with mitoARCUS. MitoTracker stains mitochondria red, Flag stains mitoARCUS green, and merged image shows colocalization (yellow) of mitoARCUS to mitochondria. Images taken at  $\times 40$  magnification. This experiment was repeated twice with identical results. **(d)** Western blot depicting mitoARCUS expression (FLAG) in HEK293T cells 24 h after transfection with either CF or CSF construct. Lanes CF + GFP and CSF + GFP depict protein expression in cells transfected with mitoARCUS constructs in which we added a GFP sequence. Lane Unt represents untransfected cells. Lane GFP represents cells transfected with GFP only. Tubulin (Tub) expression was used as a loading control. This experiment was performed once.

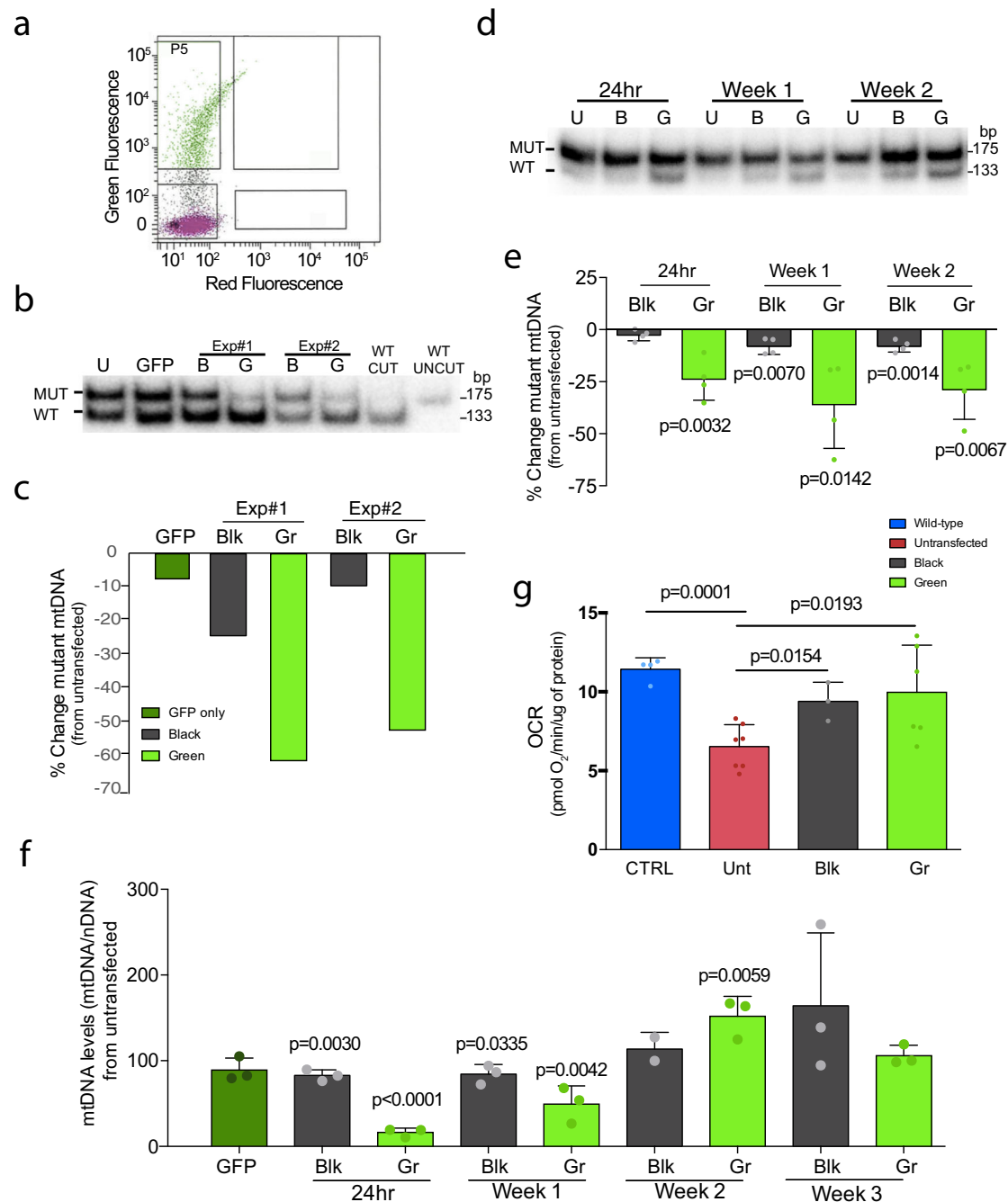
transfection. Co-transfected cells were fluorescence-activated cell (FACS) sorted 24 h later into “Black” populations (not transfected) and “Green” populations (green fluorescence, transfected) (Fig. 2a). We used PCR/restriction fragment length polymorphism (RFLP) to determine mtDNA heteroplasmy changes in the “Black” and “Green” cell populations of two independent experiments (Fig. 2b). Quantification showed that there was a large shift (50–60%) in heteroplasmy in the “Green” population when compared to the “Black” population. Cells transfected only with the GFP plasmid did not show changes in heteroplasmy. Not surprisingly, there was a small shift in the “Black” cell populations (10–20%) that can be explained by some cells in the “Black” population not having incorporated GFP co-transfectant plasmid, but likely did incorporate the mitoARCUS plasmid (Fig. 2c).

To determine the biological significance of heteroplasmic change, we used an MEF cell line that harbored high levels (90%) of mutant mtDNA<sup>20</sup>. We co-transfected cells with plasmids expressing mitoARCUS and GFP, and sorted them as described above. mtDNA was analyzed 1, 7, 14, and 21 days after transfection by PCR/RFLP. Again, GFP-positive cells comprised 11–20% of the total cell population after transfection. There was a significant shift in heteroplasmy (~25%) in “Green” cells at 24 h post transfection that was maintained over a 2-week period (Fig. 2d, e). As expected, there was a depletion of total mtDNA levels in the “Green” cell populations 24 h after transfection, which then returned to normal levels after 21 days (Fig. 2f). The “Black” population had a very mild decrease, likely because some cells received the mitoARCUS, as previously explained (Fig. 2f). Cells grown for 3 weeks were analyzed for their oxygen consumption rate (OCR). We found that untransfected cells had impaired respiration compared to WT controls. On the other hand, “Green” cell populations had significantly improved OCR (Fig. 2g). We also observed a small improvement in OCR in the “Black” cells (Fig. 2g), which is not surprising because of the mild change in heteroplasmy discussed above.

**In vivo administration of mitoARCUS.** MitoARCUS was cloned into an AAV9 vector to produce viral particles for in vivo applications. AAV9-mitoARCUS was administered systemically via retro-orbital injection in heteroplasmic mice carrying the m.5024C>T mutation<sup>30</sup>. AAV9-GFP was used as a control in a different group of heteroplasmic mice. Toe biopsies were used to determine starting levels of heteroplasmy prior to injection and showed varying levels of heteroplasmy between animals, but most were around 50–80% mutant. We injected juvenile animals at 2.5 weeks of age, as well as adult animals at 6 weeks of age. The injected animals were killed 6, 12, and 24 weeks post injection (PI), and the heart, tibialis anterior (TA), quadriceps, gastrocnemius, kidney, liver, brain, and spleen were collected for analysis. In addition, we injected another group of mice at 2.5 weeks and killed them at 5 and 10 days PI for the analysis of early events.

**MitoARCUS effectively shifted mtDNA heteroplasmy in juvenile animals.** Heteroplasmic m.5024C>T mice were injected systemically with AAV9-mitoARCUS at 2.5 weeks of age. AAV9-mitoARCUS-injected animals showed consistent expression of mitoARCUS in the heart, skeletal muscles, and sometimes the liver at all time points: 6, 12, and 24 weeks PI, as shown by western blot analysis using a Flag antibody against the construct (Fig. 3a). AAV9-GFP-injected animals showed GFP expression in the same tissues, although with higher expression in the liver at 6 and 12 weeks PI (Fig. 3a). Corresponding RFLP analysis showed a significant decrease in mutant mtDNA in the liver and TA at 6 weeks PI in AAV9-mitoARCUS-injected animals (Fig. 3a). Over time, heteroplasmy shifts became greater, and at 24 weeks PI, there was a significant decrease in mutant mtDNA in the heart, skeletal muscles, kidney, and liver (Fig. 3b). AAV9-GFP-injected controls had similar levels of mutation across all tissues after injection (Fig. 3a, b). Brain was used as a negative control to normalize changes in heteroplasmy, because no expression was observed in the brain after injection of either AAV9-mitoARCUS or AAV9-GFP (Fig. 3a). There was no significant depletion of mtDNA levels seen in any of the analyzed tissues at 6, 12, or 24 weeks PI (Fig. 3c), demonstrating that there was no major nonspecific mtDNA effects. Mice weights did not differ between mitoARCUS-treated and control animals at all time points (Supplementary Fig. 1a–f).

As, despite the major heteroplasmy shift, there was no clear expression of the mitoARCUS in the liver at 6, 12, or 24 weeks PI, we injected additional animals at 2.5 weeks and killed them 5 and 10 days PI. At 5 and 10 days PI, mitoARCUS expression was only detected in the liver (Supplementary Figs. 2a and 3a). However, GFP expression was also visible in the heart, skeletal muscles, and liver, possibly because of higher expression of this construct or a better antibody (Supplementary Figs. 2a and 3a). Accordingly, heteroplasmy changes at 5 and 10 days PI were only observed in liver (Supplementary Figs. 2b and 3b). There was an average of 22% reduction in mutant mtDNA at 5 days PI (Supplementary Fig. 2c) and 55% at 10 days PI (Supplementary Fig. 3c). To determine whether apoptosis played a role in these changes, we analyzed the expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA a marker of liver regeneration), Caspase-3, and cleaved Caspase3 in liver samples. We observed no differences between mitoARCUS-treated animals and controls at both time points (Supplementary Figs. 2d and 3d). We observed similar levels of uncleaved caspase-3 in treated and control animals, but not cleaved caspase-3 (Supplementary Figs. 2d and 3d). In addition, we did not observe depletion of total mtDNA levels at 5 or 10 days PI in the liver or TA (Supplementary Figs. 2e and 3e). Furthermore, hematoxylin and eosin staining of the liver did not show any morphological differences between

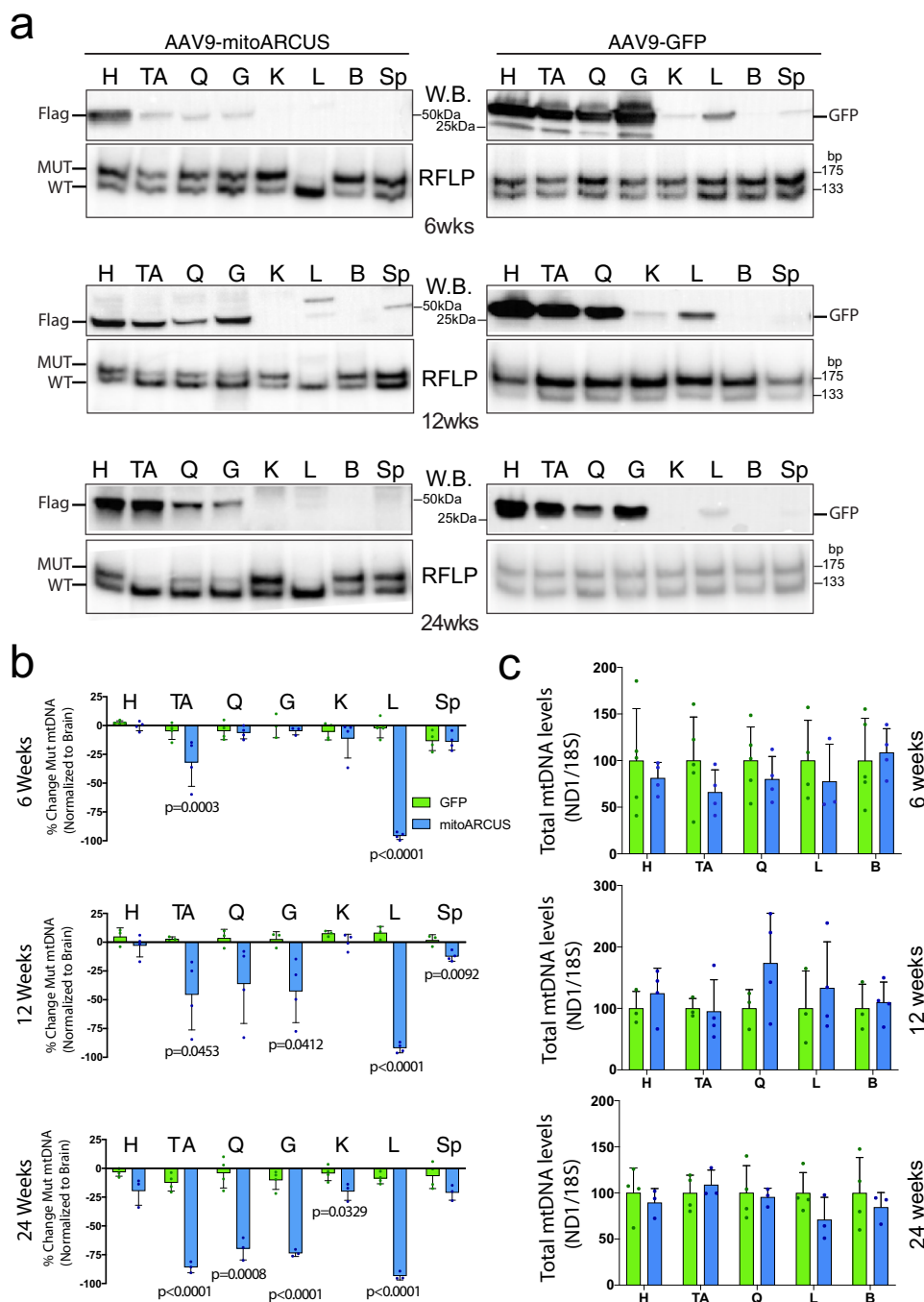


**Fig. 2** mitoARCUS effect on heteroplasmic cells carrying the tRNA<sup>Ala</sup> mutation (m.5024C>T). **a** Example of FACS cell sorting gating. Cells were sorted by the presence of GFP co-expression: “Black” cells (bottom gate) and “Green” cells (top gate). **b** RFLP-HOT PCR analysis of two independent transfections and cell-sorting experiments of heteroplasmic cells carrying 50% m.5024C>T mutation. Mutant levels in the Green cell populations (Gr) were compared to Untransfected cells (U). This experiment was done once. **c** Quantification of heteroplasmy shift from the two cell-sorting experiments in cells carrying 50% mutation described in **b**. Results were compared to Untransfected cell heteroplasmy. **d** RFLP “last-cycle hot” PCR analysis of heteroplasmic cells carrying high heteroplasmic mutant load (90%) transfected with mitoARCUS over time. This experiment was repeated three times with similar results. **e** Quantification of Fig. 2d. Values are normalized to Untransfected cells. Black cells are named Blk ( $n = 4$ ). **f** Total mtDNA levels were checked in highly mutant cells transfected with mitoARCUS and compared to untransfected cells 24 h after transfection, and followed for 3 weeks after transfection ( $n = 3$ ). p values are related to untransfected cells (100%). **g** Oxygen consumption rate (OCR) was deduced in cells carrying high levels of heteroplasmic mutant mtDNA that were transfected with mitoARCUS and grown for 3 weeks [ $n = 3$  (CTRL),  $n = 7$  (Unt),  $n = 3$  (Blk),  $n = 7$  (Gr)]. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed Student’s *t*-test.

AAV9-mitoARCUS-injected, AAV9-GFP-injected, and non-injected controls (Supplementary Fig. 4).

Even though mitoARCUS localized exclusively to the mitochondria, we tested whether nuclear off-target editing occurred. To do so, targeted amplicon sequencing was performed on a

selection of the sites that were identified from an in vitro, genome-wide, unbiased off-targeting assay based on GUIDE-Seq<sup>31</sup> (see “Methods”). DNA from the TA and liver tissues from the young mice killed at 24 weeks PI were evaluated by targeted amplicon sequencing. This method of analysis detects any genetic

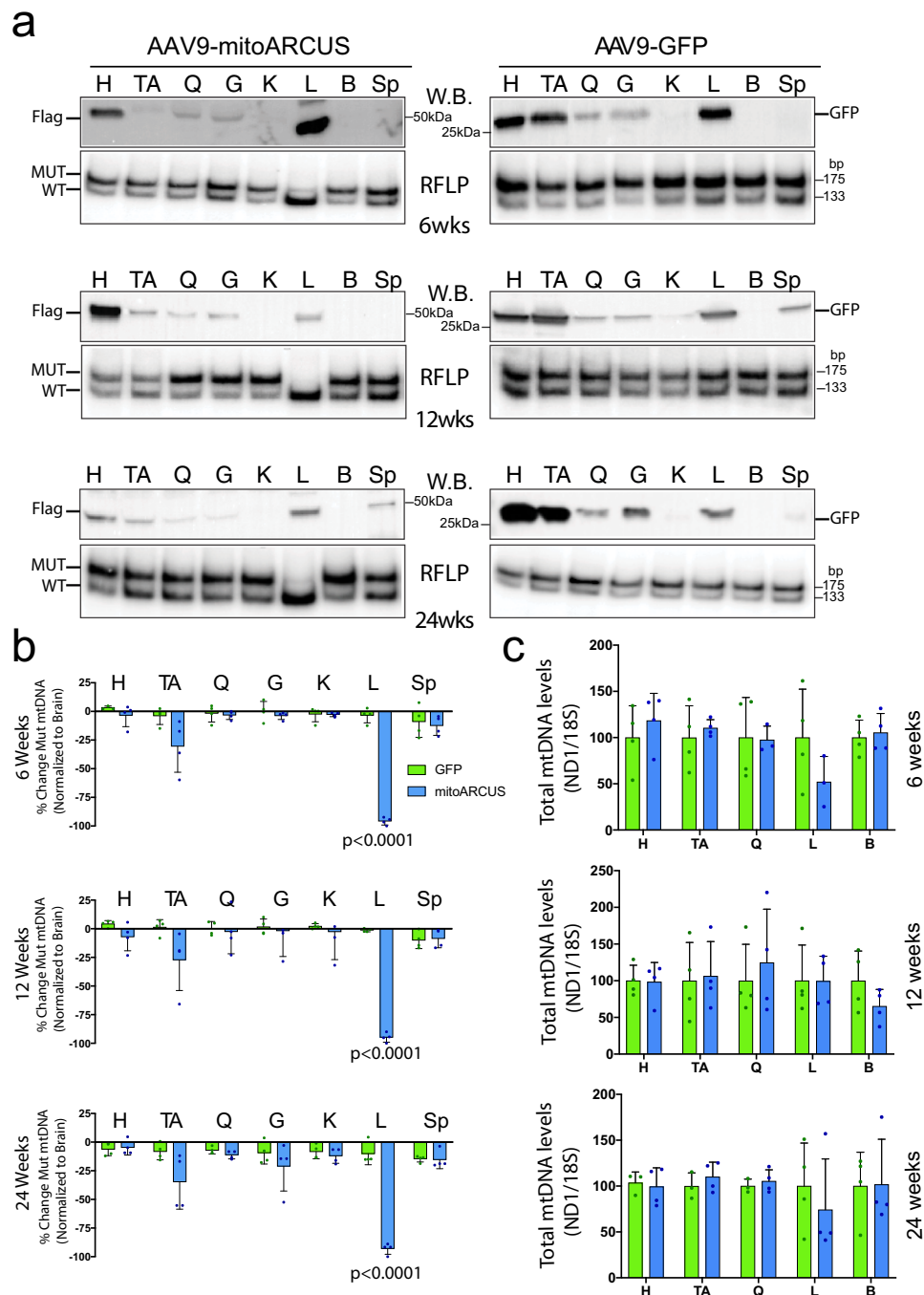


**Fig. 3 AAV9-mitoARCUS effect in treated juvenile mice.** **a** Representative western blottings (W.B.) of homogenates (top panels) with Flag antibody for AAV9-mitoARCUS samples and GFP antibody for AAV9-GFP samples. RFLP “last-cycle hot” PCR analysis (RFLP, bottom panels) of DNA samples from the same injected animals at 6, 12, and 24 weeks PI. Similar analyses were performed for each animal. **b** Quantification of heteroplasmy shift shown as a percent change in heteroplasmy across all tissues at 6, 12, and 24 weeks PI normalized to brain tissue. Heteroplasmy levels of the heart (H), tibialis anterior (TA), quadriceps (Q), gastrocnemius (G), kidney (K), liver (L), and spleen (Sp) were compared to that of the brain (B) (negative for expression of mitoARCUS). **c** Quantification by RT-PCR of total mtDNA levels in the skeletal muscle, liver, and brain at 6 and 24 weeks PI using ND1 and ND5 mitochondrial primer/probes normalized to 18S (nuclear DNA). Data are mean ± SEM of  $n = 4$  (with exception of 6 weeks GFP ( $n = 5$ ) and 24 weeks mitoARCUS ( $n = 3$ )). Statistical analysis was performed using two-tailed Student’s *t*-test.

variation within the amplicon, such as an indel. No indels were detected at any of the sites analyzed for any of the animals.

**MitoARCUS effectively shifted mtDNA heteroplasmy in adult animals.** Heteroplasmic m.5024C>T mice were also injected systemically with AAV9-mitoARCUS at 6 weeks of age, an age

that is less permissive to AAV-mediated expression compared to 2.5 weeks. Still, a strong expression was observed in the heart and liver, with weaker expression in skeletal muscles (Fig. 4a). AAV9-GFP-injected mice showed strong expression in the heart, TA, and liver, with weaker expression in quadriceps and gastrocnemius (Fig. 4a). RFLP analysis showed an essentially complete elimination of mutant mtDNA in the liver as early as 6 weeks

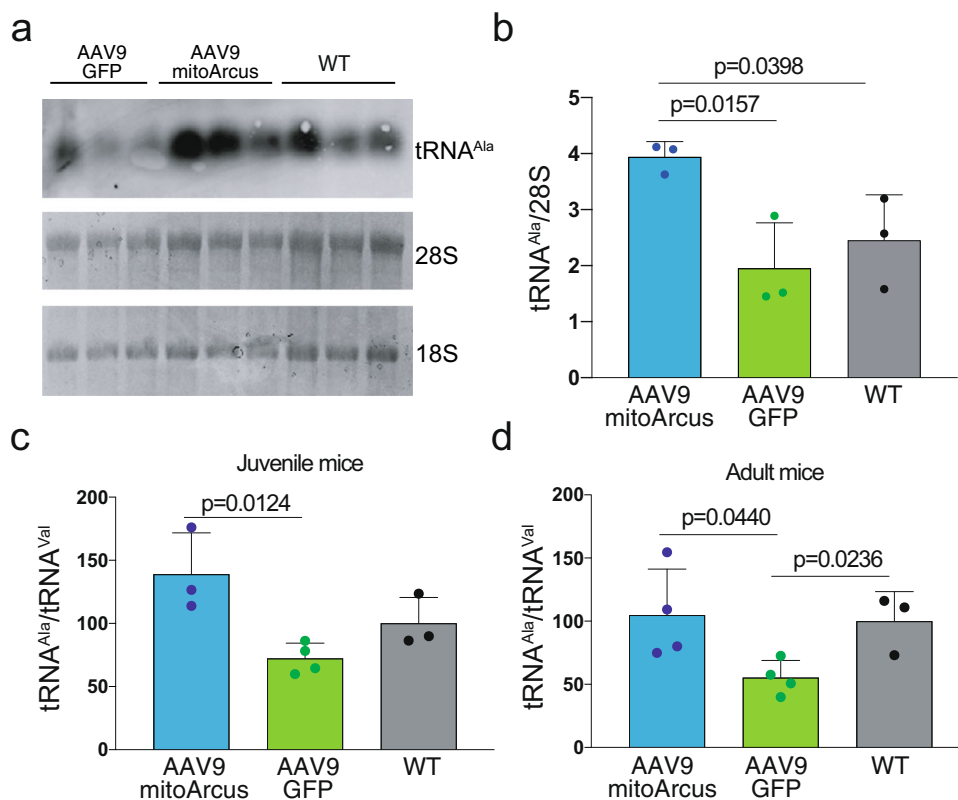


**Fig. 4** AAV9-mitoARCUS effect in treated adult mice. **a** Representative western blottings (W.B.) of homogenates (top panels) with Flag antibody for AAV9-mitoARCUS samples and GFP antibody for AAV-GFP samples. RFLP “last-cycle hot” PCR analysis (RFLP, bottom panels) of DNA samples from the same injected animals, at 6, 12, and 24 weeks PI. Similar analyses were performed for each animal. **b** Quantification of heteroplasmy shift shown as percent change in heteroplasmy across all tissues at 6, 12, and 24 weeks PI normalized to brain tissue. Heteroplasmy of the heart (H), tibialis anterior (TA), quadriceps (Q), gastrocnemius (G), kidney (K), liver (L), and spleen (Sp) were compared to that of the brain (negative for expression of mitoARCUS). **c** Quantification by qPCR of total mtDNA levels were measured in the heart, skeletal muscle, liver, and brain (B) at 6 and 24 weeks PI using ND1 and ND5 mitochondrial primer/probes normalized to 18S (nuclear DNA). Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 4$ . Statistical analysis was performed using two-tailed Student’s *t*-test.

after injection in mitoARCUS-treated animals, which persisted over time (Fig. 4b). Some skeletal muscles showed a trend in decreasing mutant mtDNA (TA, gastrocnemius at 24 weeks PI), but results did not reach significance (Fig. 4b). AAV9-GFP-injected animals showed no change in the levels of heteroplasmy across all tissues (Fig. 4a, b). Brain was used to normalize the changes. Total mtDNA levels were slightly decreased in the liver

6 weeks PI of the AAV9-mitoARCUS-treated animals, but not after 12 or 24 weeks PI (Fig. 4c).

**Mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels were restored in the liver of mice treated with AAV9-mitoARCUS.** Mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels are decreased in tissues with high levels of mutant mtDNA in the m.5024C>T



**Fig. 5** mitoARCUS-induced increase in mt-tRNA<sup>Ala</sup> in the liver. **a** Northern blot analysis of juvenile mouse liver 24 weeks PI probed for mt-tRNA<sup>Ala</sup> and total RNA loading (28S and 18S). **b** Quantification of mt-tRNA<sup>Ala</sup> (from panel a) normalized to 28S rRNA ( $n = 3$ ). Riboruler high-range molecular marker was used, but the lowest marker was 200 nt, whereas the tRNA are ~75 nt. **c** Quantification of mt-tRNA<sup>Ala</sup> by qPCR compared to levels of mt-tRNA<sup>Val</sup> in juvenile mouse liver 24 weeks PI. RNA samples from AAV9-mitoARCUS-treated animals compared to AAV9-GFP controls and WT liver samples ( $n = 3$  with the exception of GFP  $n = 4$ ). **d** Quantification of mt-tRNA<sup>Ala</sup> compared to levels of mt-tRNA<sup>Val</sup> in adult mouse liver. RNA samples from AAV9-mitoARCUS-treated animals compared to AAV9-GFP controls and WT liver samples, at 24 weeks PI ( $n = 4$  with the exception of WT  $n = 3$ ). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed Student's *t*-test.

tRNA<sup>Ala</sup> mice<sup>20,32</sup>. We determined the mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels in the liver of juvenile mice 24 weeks PI by northern blotting. Results showed an increased amount of mt-tRNA<sup>Ala</sup> in AAV9-mitoARCUS-injected animals compared to AAV9-GFP-injected controls when normalized to 28S rRNA (Fig. 5a, b). We further used quantitative PCR (qPCR) to determine the ratio of mt-tRNA<sup>Ala</sup> to mt-tRNA<sup>Val</sup>. These results confirmed the northern blotting results (Fig. 5c, d). By qPCR, we found that AAV9-mitoARCUS-treated juvenile animals had significantly higher levels of mt-tRNA<sup>Ala</sup> compared to controls (AAV9-GFP, Fig. 5c). Adult animals injected with AAV9-mitoARCUS also had increased mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels in the liver compared to controls (AAV9-GFP) (Fig. 5d).

## Discussion

Currently, most mitochondrial disorders have no treatment and care is only palliative. The ability to shift mtDNA heteroplasmy is a promising treatment approach for severe heteroplasmic mitochondrial disorders. This can be done by decreasing levels of mutant mtDNA to below disease threshold levels, to ameliorate phenotypes.

Many DNA-editing enzymes have been used to shift heteroplasmy, but they have their pitfalls in terms of potential clinical use. MitoZFN's and mitoTALENs have a heterodimeric architecture, making packaging into viral vectors difficult, requiring that each monomer is packaged into separate viral vectors. The CRISPR-Cas9 system is not appropriate for mtDNA

modification, because mitochondria do not have an RNA import mechanism<sup>33</sup>. More recently, a base editor DdCBE was shown to edit cytosines preceded by thymidines<sup>34</sup>. However, the sequence requirements limit its potential use at this time<sup>35</sup>. It has, however, recently been used to edit mtDNA in mouse embryos<sup>36</sup>. MitoARCUS overcomes disadvantages that mitoZFN and mitoTALENs present with size and viral packaging. As recombinant AAV has a packaging limit of up to 4.5 kb<sup>37</sup>, mitoARCUS can be packaged into a single viral vector, which avoids problems with dilution of titer and can be injected at higher doses<sup>25–27</sup>.

MitoARCUS-induced heteroplasmic shifts of up to 60% in cell culture experiments after 24 h and those changes were consistent for up to 3 weeks. This shift was enough to see an improvement of mitochondrial function in mitoARCUS-treated cells, such as the increase in OCR when compared to controls transfected with pLenti-GFP and untransfected cells. In cell-sorting experiments, a small shift in heteroplasmy was observed in “Black” cells, because we co-transfected cells with a mix of mitoARCUS and GFP-expressing plasmid (2 : 1 ratio). Although this increases the odds that “Green” cells co-express the mitoARCUS, some cells are expected to internalize mitoARCUS but not the GFP plasmid.

Cells treated with mitoARCUS showed a depletion of total mtDNA levels 24 h after transfection, but levels quickly recovered to normal over 3 weeks' time. As mitochondrial copy number is tightly regulated, transient depletion of mtDNA was recovered by the replication of residual mtDNA molecules to bring mtDNA levels back to normal<sup>38</sup>. Although we cannot rule out that some

WT mtDNA were cleaved by the nuclease, the fast recovery indicates that it is specific enough to promote a robust elimination of the mutant mtDNA.

When tested *in vivo*, AAV9-mitoARCUS effectively shifted heteroplasmy in several of the analyzed tissues of juvenile animals, with no depletion in total mtDNA levels at 6, 12, or 24 weeks. The more robust heteroplasmy shifts in juvenile animals compared to adult, treated animals are not surprising, as this was previously observed before in gene therapy studies<sup>39</sup> and is likely due to the young immune system being more receptive to the AAV therapy. However, differences in viral titer could also play a role, as juvenile animals were injected with 1.5× more vgs/kg of AAV9-mitoARCUS than adults. Mice at 2.5 weeks roughly correspond to a 2-year-old human and mice at 6 weeks old to a 20-year-old human<sup>40</sup>. These results suggest that this therapeutic approach could be more effective in younger patients. Also, fine-tuning dosing of AAV9-mitoARCUS could prevent a mtDNA depletion, while still inducing a heteroplasmic shift large enough to improve mitochondrial function, as was previously shown when mitoZFN were used at a lower dose<sup>16</sup>. In addition, the increase in mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels in experimental animals further indicated that heteroplasmy shift *in vivo* can induce biochemical changes.

Mutant mtDNA in the liver was almost completely eliminated 6 weeks after injection of the AAV9-mitoARCUS. However, the expression of mitoARCUS in the liver at this time point was relatively low. As AAV9 is highly hepatotropic<sup>28</sup>, AAV9-mitoARCUS likely transduced the liver strongly, but very early after injection, shifting heteroplasmy in the liver to nearly all wild-type mtDNA. As the liver is a highly metabolically active tissue, AAV9-mitoARCUS may have been mostly flushed out before the 6-week time point. On the contrary, other post-mitotic tissues such as the skeletal muscle, maintained expression through 24 weeks after injection of AAV9-mitoARCUS. This hypothesis was confirmed by analyzing animals 5 and 10 days after injection, which showed a strong mitoARCUS expression in the liver, but not in other tissues.

Although AAV9 has been shown to have tropism in a wide array of tissues<sup>28,41,42</sup>, we did not find a strong expression in the central nervous system, which agrees with our previous experience with AAV9<sup>17,18,20</sup>. Curiously, we saw expression of AAV9-mitoARCUS in the heart, but with a small effect on heteroplasmy. We do not have an explanation for the cardiac resistance to mtDNA heteroplasmy change, but some cell types within the heart may be better transduced with AAV9 than others.

There has been an increased interest in recent years in the development of new AAV serotypes and their tissue specificity<sup>43–47</sup>, and how it varies in different hosts. This is the case of a recent study where authors found that the genetic background of mice greatly affected the efficacy and specificity of transduction using the same AAV serotype<sup>48,49</sup>. The hope is that newly engineered strains of AAV and tissue-specific promoters will be able to overcome these barriers<sup>50</sup>.

In conclusion, mitoARCUS is a promising tool for eliminating mutant mtDNA. Its compact size, monomeric structure, ability to recognize new target sequences, and ability to produce large shifts with minimal negative effects suggest that it could be further developed for *in vivo* applications.

## Methods

**MitoARCUS construct design.** Precision BioSciences used *in silico* predictions and directed evolution methods to re-engineer *I-Cre1*, to recognize the m.5024C>T point mutation as described<sup>26,27</sup>. A peptide linker was used to fuse both homodimers into a monomeric structure<sup>26,27</sup>. The specificity of the mitoARCUS was

initially confirmed in CHO cells using an engineered split-GFP assay as described in Fig. 1a.

**Animal model and fibroblasts.** We used a heteroplasmic mouse model carrying a m.5024C>T point mutation in the tRNA<sup>Ala</sup> gene. This mouse model has been previously characterized<sup>20,32,51</sup> and present with a mild cardiomyopathy at 2 years of age, as well as reduced mt-tRNA<sup>Ala</sup> levels when mutation levels are >50% in the tissue. MEFs derived from this mouse were characterized for the levels of mutant mtDNA and immortalized with the E6–E7 gene of the human papilloma virus<sup>20</sup>. Wild-type animals and WT lung fibroblast cells used as controls were derived from mice with C57BL/6J background. To produce an MEF line with high levels of mutation, a mitoTALEN targeting WT mtDNA was designed. MEFs were transfected with the mitoTALEN, sorted, and clones were grown and tested for high levels of mutant mtDNA<sup>20</sup>.

We have complied with all relevant ethical regulations for animal testing and research. The work with mice was approved by the University of Miami Institutional Animal Care and Use Committee.

**Cell culture, transfection, and sorting.** Heteroplasmic MEFs were transfected using GenJet DNA In Vitro Transfection Reagent (Ver. II) (SL100489, SigmaGen Laboratories) using the manufacturer's protocols. We transfected cells plated in a T75 flask at 80% confluence with 30 µg plasmid total, in a 2 : 1 ratio of mitoARCUS CF or CSF plasmid (20 µg) to GFP plasmid (10 µg). Twenty-four hours after transfection, sorting was performed using FACS Aria IIU, gating on single-cell fluorescence using a 488 nm laser and 505LP, 530/30 filter set for GFP expression. Cells were sorted into Black populations (no GFP expression) and Green populations (GFP expression). Untransfected control cells were also passed through the cell sorter in order to expose cells to the same conditions<sup>18,20,21</sup>. HeLa cells (CCL-2 Cells, ATCC) and HEK293T (CRL-3216, ATCC) were used.

**Immunofluorescence analysis.** HeLa cells were plated onto coverslips and transfected with mitoARCUS for 24 h. Cells were incubated for 1 h at 37 °C with 200 nM MitoTracker Red CMXRos (M7512, Invitrogen), protected from light. Then, cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT). Cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in phosphate saline buffer (PBS) for 2 min at RT. A 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS solution was used to block for 1 h at RT. The primary antibody against Flag (F3165, Sigma) at a 1 : 200 concentration in 2% BSA/PBS was incubated for 1 h at RT. After washing, cells were incubated with the secondary antibody: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A-11008, Invitrogen) at a 1 : 200 concentration in 3% BSA/PBS for 1 h at RT, protected from light. Coverslips were then washed with PBS and mounted onto slides using a 4',6'-diamidino-2-phenylindole-containing mounting medium (Everbrite Mounting Medium, Biotium). Images were captured using a Zeiss LSM510 confocal microscope<sup>11,20</sup>.

**AAV9 preparation and administration.** The mitoARCUS was cloned into an AAV2/9 plasmid and sent to the University of Iowa Viral Core Facility, which produced virus with 1.6 × 10<sup>13</sup> vg/ml titer for AAV-mitoARCUS and 5.9 × 10<sup>13</sup> vg/ml of AAV9-GFP. Both juvenile (2.5 weeks of age) and adult mice (6 weeks of age) were injected retro-orbitally as described<sup>20,30</sup>. Juvenile mice received 6.67 × 10<sup>13</sup> vgs/kg of AAV9-mitoARCUS or 6.15 × 10<sup>13</sup> vgs/kg of AAV9-GFP into the left retro-orbital sinus. Adults received 4.0 × 10<sup>13</sup> vgs/kg of AAV9-mitoARCUS or 3.69 × 10<sup>13</sup> vgs/kg AAV9-GFP into the left retro-orbital sinus. Control animals were injected with similar titers of AAV9-GFP, respective of age-matched experimental animals. Injections were carried out using a 31 G needle with syringe (08290-8438-01, BD). Toe biopsies were collected at 6 days of age, to determine base heteroplasmy levels. At 6, 12, and 24 weeks PI, mice were anesthetized with Ketamine and Xylazine, and were perfused with PBS. The heart, TA, quadriceps, gastrocnemius, kidney, liver, and spleen were collected. Samples were flash frozen in liquid nitrogen and then stored at –80 °C until further use. All animal procedures were approved by the University of Miami Animal Care and Use Committee.

**MitoARCUS expression.** Total protein homogenate was prepared from flash-frozen tissues and protein was quantified using DC protein assay (5000116, BioRad) according to the manufacturer's instructions. Forty-micrograms of total protein per sample was run in 10% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (4568034, BioRad), then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (1620260, BioRad) using the TransBlot Turbo system (1704155, BioRad) according to the manufacturer's instructions. TGX Stain-Free Protein Gels allow the visualization of total protein loading through gel activation with the BioRad Chemidoc system. Blots were blocked for 1 h at RT with 5% milk. Antibodies used were mouse monoclonal Flag (F3165, Sigma) (1 : 1000), mouse monoclonal GFP (75-131, UC Davis) (1 : 1000), mouse monoclonal MTCO1 (ab14705, Abcam) (1 : 1000), mouse monoclonal NDUFB8 (ab110242, Abcam) (1 : 750), mouse monoclonal Tubulin (T9026, Sigma) (1 : 20,000), rabbit polyclonal Caspase-3 (#9662, Cell Signaling) (1 : 1000), and mouse monoclonal PCNA (PC10 #2586, Cell Signaling) (1 : 2000). Secondary antibody was IgG horseradish peroxidase-linked mouse (7076, Cell Signaling) (1 : 5000) or rabbit (7074, Cell Signaling) (1 : 5000).

The primary antibody was incubated overnight at 4 °C and secondary antibody incubated for 1 h at RT. Membranes were developed with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (34080, Thermo Scientific) and were imaged in the BioRad Chemidoc imager. BioRad Image Lab (version 6.0.1) was used to analyze blots<sup>11,20</sup>.

**DNA extraction, quantification by “last-cycle HOT” PCR, and RFLP.** Total DNA was extracted from flash-frozen tissues using phenol–chloroform and from FACS-sorted cells using the NucleoSpin Tissue XS kit (740901.50, Takara). DNA concentration was determined spectrophotometrically (BioTek Synergy H1 hybrid). Levels of the m.5024C>T mutation were determined by “last-cycle hot” PCR<sup>22</sup>, wherein the last cycle of the PCR is run using radioactively labeled nucleotides. This method removes interference from heteroduplexes formed by previous melting and annealing steps by only allowing visualization of nascent amplicons. PCR amplicons were obtained with the following primers: F-5'-CCACCCTAGCTATCATAAGCACA-3' and B-5'-AAGCAATTGATTTG-CATTCAATAGATGTAGGATGAAGTCCTGCA-3'<sup>20</sup>. RFLP analysis was done by digesting amplicons with PstI-HF (R3140S, New England BioLabs), which digests the WT mtDNA but not the mutant mtDNA carrying the m.5024C>T point mutation. After digestion, products were run in a 12% polyacrylamide gel and signal was detected using the Cyclone phosphor-imaging system (Perkin Elmer) and OptiQuant software Version 5.0 (Perkin Elmer)<sup>20</sup>.

**qPCR to determine total mtDNA levels.** To determine the total levels of mtDNA present in samples, we performed qPCR using TaqMan reagents (PrimeTime Std qPCR Assay, Integrated DNA Technologies)<sup>20</sup>. Samples were run on a BioRad CFX96/C1000 qPCR machine. Comparative cycle threshold (Ct) method was used to determine relative reads and total mtDNA levels were determined by comparing mtDNA (ND1 and ND5) to genomic DNA (18S). The following primer/probe sets were used<sup>20</sup>.

*mtDNA. ND1* = Forward: 5'-GCC TGA CCC ATA GCC ATA AT-3' (NC\_005089; mtDNA 3282-3301); reverse: 5'-CGG CTG CGT ATT CTA CGT TA-3' (mtDNA 3402-3383). Probe: 5'-/56-FAM/TCT CAA CCC/ZEN/TAG CAG AAA CAA CCG G/3IABkFQ/-3' (mtDNA 3310-3334).

*ND5* = Forward: 5'-CCC ATG ACT ACC ATC AGC AAT AG-3' (mtDNA 12432-12454); reverse: 5'-TGG AAT CGG ACC AGT AGG AA-3' (mtDNA 12533-12514). Probe: 5'-/5TET/AGT GCT/ZEN/GAA CTG GTG TAG GGC/3IABkFQ/-3' (mtDNA 12482-12458).

*Genomic DNA. 18s* = Forward: 5'-GCC GCT AGA GGT GAA ATT CT-3' (RefSeq NR\_046233.2; chr17:39984253-39984272); reverse: 5'-TCG GAA CTA CGA CGG TAT CT-3' (RefSeq NR\_046233.2; chr17:39984432-39984412). Probe: 5'-/5Cy5/AAG ACG GAC CAG AGC GAA AGC AT/3IABkRQSp/-3' (RefSeq NR\_046233.2; chr17:39984285-39984305).

**Oxygen consumption rate.** OCR was measured using a Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). The day prior to the assay, cells were seeded at a density of 20,000 cells/well in wells B-G (wells A and H contained media only). The XFp sensor cartridge was calibrated with calibration buffer overnight at 37 °C. The following day, cell culture medium was replaced with low-buffered Seahorse medium supplemented with 10 mM glucose, 1 mM pyruvate, and 2 mM glutamine, and incubated for at least 1 h at 37 °C. Measurements of endogenous respiration were measured following each addition of 1 μM oligomycin, 0.5 μM Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazide (FCCP), and 1 μM rotenone plus antimycin A. Results were normalized to μg protein per well after the Seahorse run and protein was quantified using DC protein assay<sup>21</sup>.

**RNA extraction, northern blot analysis, and quantification of mt-tRNA's.** RNA was isolated from flash-frozen tissues with TRIzol (Ambion) following the manufacturer's standard protocols. Samples were treated with DNase (AM1907, Invitrogen) prior to spectrophotometric quantification. Northern blot analysis was done by running 4 μg total liver RNA per sample in a 1.2% agarose gel containing 20% formaldehyde and 1× 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS). Gel was run in 1× MOPS solution, first 80 V for 15 min, then 120 V for 2.5 h. At this point, the gel was stained with ethidium bromide (EtBr) to visualize total RNA loading. The gel was then washed two times for 10 min in water to remove EtBr. RNA was transferred overnight onto a nylon membrane (Amersham Hybond-NX, #RPN203T). Transcripts of interest were detected with non-radioactive biotinylated probes overnight at 50 °C. The following day, membrane was washed and signal was detected with IRDye 800CW Streptavidin (926-32230, Li-COR)<sup>20</sup>. We used a biotinylated probe to detect mitochondrial tRNA<sup>Ala</sup> by northern blotting: 5'-[Btm]GACTTCATCCTACATCTATTG-3'.

The levels of mt-tRNA<sup>Ala</sup> and mt-tRNA<sup>Val</sup> were detected using Custom TaqMan Small RNA Assay (4398987, ThermoFisher) as per the manufacturer's directions. Relative levels of mt-tRNA<sup>Ala</sup> were calculated by dividing Ct values by mt-tRNA<sup>Val</sup> Ct values.

**Detection of nuclear off-targets.** This assay is a modification of GUIDE-seq<sup>53</sup>, known as “oligo capture,” which is more sensitive in detecting ARCUS-induced DSBs<sup>31</sup>. FL83B mouse cells were electroporated with mitoARCUS and analyzed by oligo capture 2 days after transformation. Five C57BL6J nuclear genomic sequences were identified as putative off-target sites for this nuclease, as indicated in the table below. mitoARCUS-injected heteroplasmic mouse DNA samples (TA muscle and liver) were then analyzed for the presence of indels at these five nuclear genome sites. Site 1: Chromosome 2 (5'-GTAAGGATAGTAAAGTCTTCCAA-3'); Site 2: Chromosome 2 (5'-TCAAGGATAGCACGTCTCCAAC-3'); Site 3: Chromosome 5 (5'-TTAAGGATGGTAAGACAGTATC-3'); Site 4: Chromosome 6 (5'-CTAAG GTTAGTAAAGTATCCAAC-3'); Site 5: Chromosome 2 (5'-TTCAGGATGGCA CGTCTTCATC-3'). The primers used to amplify these potential off-target sites were as follows: Site1F 5'-cgccccagcattgaagctg/Site1R tgcatggggccttagattgac-3'; Site2F 5'-acagggagagactgaaccatcacag-3'/Site2R 5'-agggggaacaaaatctagttggctag-3'; Site3F 5'-caaaactgaccgatcctctg-3'/Site3R 5'-agatcacacacatgagcaaacat-3'; Site5F 5'-cctcaagtgagcaggcactacg-3'/Site5R 5'-cgagagttcactatgactgacgatc-3'.

**Statistical analysis.** All data analysis was performed using GraphPad Prism 7 and 8. All statistics are presented as mean ± SEM. Pairwise comparisons were performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. Comparisons between >2 groups were done by one-way analysis of variance. *P*-values of ≤0.05 were considered significant. *N* = 4 mice were injected per each condition (treated vs. control, and each time point). All measurements were taken from distinct samples.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

All data and raw figures are available upon request. The only exception is the sequence of the mitoARCUS, which is under patent protection. However, it may be shared under appropriate MTAs, as detailed below: (A) Acceptance of a non-exclusive, non-transferable, non-sublicensable, and non-commercial research license during the term of the MTA that covers the use (but not the design or manufacture) of the ARCUS nucleases, solely to use them in the recipient's laboratories at the recipient's place of business to carry out a study as set forth in the MTA. (B) The licenses above will not include the right for Recipient to have any third party use any materials (including ARCUS nuclease sequence information) outside of the study and recipient shall not: (i) analyze, use (except as provided under this Agreement for the study), modify, or reverse engineer the materials (including ARCUS nuclease sequence information) in any way; or (ii) file any patent applications or seek other forms of statutory protection on the materials (including ARCUS nuclease sequence information), or any inventions conceived, discovered, developed, or otherwise made in the course of performing the study, or disclose any information or data gained from the materials (including ARCUS nuclease sequence information) or the study without the prior written consent of Precision. (C) ARCUS sequence information and all results derived from the materials or from the performance of the study shall be deemed to be confidential information of Precision. Recipient may use ARCUS sequence information and such results solely in furtherance of the study and for no other purposes. Any public disclosure or publication of ARCUS sequence information or results shall not be permitted without the prior written consent of Precision. Source data are provided with this paper.

Received: 20 November 2020; Accepted: 26 April 2021;

Published online: 28 May 2021

## References

- Schon, K. R., Ratnaik, T., van den Amele, J., Horvath, R. & Chinnery, P. F. Mitochondrial diseases: a diagnostic revolution. *Trends Genet.* **36**, 702–717 (2020).
- Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. Recent advances in mitochondrial disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **18**, 257–275 (2017).
- Gorman, G. S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann. Neurol.* **77**, 753–759 (2015).
- Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M. & Taylor, R. W. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 113–128 (2010).
- Gorman, G. S. et al. Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16080 (2016).
- Peeva, V. et al. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery. *Nat. Commun.* **9**, 1727 (2018).
- Bacman, S. R., Williams, S. L., Duan, D. & Moraes, C. T. Manipulation of mtDNA heteroplasmy in all striated muscles of newborn mice by AAV9-mediated delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther.* **19**, 1101–1106 (2012).



8. Srivastava, S. & Moraes, C. T. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 3093–3099 (2001).
9. Tanaka, M. et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease Smal into mitochondria. *J. Biomed. Sci.* **9**, 534–541 (2002).
10. Bacman, S. R., Williams, S. L., Hernandez, D. & Moraes, C. T. Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a ‘differential multiple cleavage-site’ model. *Gene Ther.* **14**, 1309–1318 (2007).
11. Bacman, S. R., Williams, S. L., Garcia, S. & Moraes, C. T. Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther.* **17**, 713–720 (2010).
12. Bayona-Bafaluy, M. P., Blits, B., Battersby, B. J., Shoubridge, E. A. & Moraes, C. T. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 14392–14397 (2005).
13. Minczuk, M., Papworth, M. A., Kolasinska, P., Murphy, M. P. & Klug, A. Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 19689–19694 (2006).
14. Minczuk, M., Papworth, M. A., Miller, J. C., Murphy, M. P. & Klug, A. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3926–3938 (2008).
15. Gammage, P. A., Rorbach, J., Vincent, A. I., Rebar, E. J. & Minczuk, M. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Mol. Med.* **6**, 458–466 (2014).
16. Gammage, P. A. et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7804–7816 (2016).
17. Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M., Peralta, S. & Moraes, C. T. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat. Med.* **19**, 1111–1113 (2013).
18. Hashimoto, M. et al. MitoTALEN: a general approach to reduce mutant mtDNA loads and restore oxidative phosphorylation function in mitochondrial diseases. *Mol. Ther.* **23**, 1592–1599 (2015).
19. Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M. & Moraes, C. T. The use of mitochondria-targeted endonucleases to manipulate mtDNA. *Methods Enzymol.* **547**, 373–397 (2014).
20. Bacman, S. R. et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA(Ala) levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat. Med.* **24**, 1696–1700 (2018).
21. Pereira, C. V. et al. mitoTev-TALE: a monomeric DNA editing enzyme to reduce mutant mitochondrial DNA levels. *EMBO Mol. Med.* **10**, e8084 (2018).
22. Arnould, S. et al. The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 27–31 (2011).
23. Arnould, S. et al. Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J. Mol. Biol.* **355**, 443–458 (2006).
24. Antunes, M. S., Smith, J. J., Jantz, D. & Medford, J. I. Targeted DNA excision in Arabidopsis by a re-engineered homing endonuclease. *BMC Biotechnol.* **12**, 86 (2012).
25. Jantz, D. & Smith, J. J. Recognition sequences for I-CreI-derived meganucleases and uses thereof. US Patent US9683257B2 (2017).
26. Smith, J. J. & Jantz, D. Rationally-designed meganucleases with altered sequence specificity and DNA-binding affinity. US Patent US8021867B2 (2013).
27. Smith, J. J., Jantz, D. & Hellinga, H. W. Rationally designed meganucleases with altered sequence specificity and DNA-binding affinity. US Patent 201113245596 A (2012).
28. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. & Rabinowitz, J. E. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* **16**, 1073–1080 (2008).
29. Candas, D., Qin, L., Fan, M. & Li, J. J. Experimental approaches to study mitochondrial localization and function of a nuclear cell cycle kinase, Cdk1. *J. Vis. Exp.*, 53417 (2016).
30. Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M. & Hoogstraten-Miller, S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim. (NY)* **40**, 155–160 (2011).
31. Wang, L. et al. Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol. *Nat. Biotechnol.* **36**, 717–725 (2018).
32. Kauppila, J. H. K. et al. A phenotype-driven approach to generate mouse models with pathogenic mtDNA mutations causing mitochondrial disease. *Cell Rep.* **16**, 2980–2990 (2016).
33. Gammage, P. A., Moraes, C. T. & Minczuk, M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized. *Trends Genet.* **34**, 101–110 (2018).
34. Mok, B. Y. et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* **583**, 631–637 (2020).
35. Bacman, S. R. & Moraes, C. T. Mitochondrial DNA base editing: good editing things still come in small packages. *Mol. Cell* **79**, 708–709 (2020).
36. Lee, H. et al. Mitochondrial DNA editing in mice with DddA-TALE fusion deaminases. *Nat. Commun.* **12**, 1190 (2021).
37. Grieger, J. C. & Samulski, R. J. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J. Virol.* **79**, 9933–9944 (2005).
38. Moraes, C. T. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet.* **17**, 199–205 (2001).
39. Gray, S. J. Timing of gene therapy interventions: the earlier, the better. *Mol. Ther.* **24**, 1017–1018 (2016).
40. Dutta, S. & Sengupta, P. Men and mice: relating their ages. *Life Sci.* **152**, 244–248 (2016).
41. Katwal, A. B. et al. Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery. *Gene Ther.* **20**, 930–938 (2013).
42. Bish, L. T. et al. Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum. Gene Ther.* **19**, 1359–1368 (2008).
43. Martino, A. T. et al. Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells. *Blood* **121**, 2224–2233 (2013).
44. Wang, L. et al. Comparative study of liver gene transfer with AAV vectors based on natural and engineered AAV capsids. *Mol. Ther.* **23**, 1877–1887 (2015).
45. Kanaan, N. M. et al. Rationally engineered AAV capsids improve transduction and volumetric spread in the CNS. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **8**, 184–197 (2017).
46. Hickey, D. G. et al. Tropism of engineered and evolved recombinant AAV serotypes in the rd1 mouse and ex vivo primate retina. *Gene Ther.* **24**, 787–800 (2017).
47. Li, C. & Samulski, R. J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 255–272 (2020).
48. He, T. et al. The influence of murine genetic background in adeno-associated virus transduction of the mouse brain. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **30**, 169–181 (2019).
49. Matsuzaki, Y. et al. Neurotropic properties of AAV-PHP.B are shared among diverse inbred strains of mice. *Mol. Ther.* **27**, 700–704 (2019).
50. Pacak, C. A., Sakai, Y., Thattaliyath, B. D., Mah, C. S. & Byrne, B. J. Tissue specific promoters improve specificity of AAV9 mediated transgene expression following intra-vascular gene delivery in neonatal mice. *Genet. Vaccines Ther.* **6**, 13 (2008).
51. Gammage, P. A. et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat. Med.* **24**, 1691–1695 (2018).
52. Moraes, C. T., Ricci, E., Bonilla, E., DiMauro, S. & Schon, E. A. The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 934–949 (1992).
53. Tsai, S. Q. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.* **33**, 187–197 (2015).

## Acknowledgements

This work was supported primarily by the Muscular Dystrophy Association and the National Institute of Health Grants 5R01EY010804. Additional support was received from NIH grants 1R01NS079965, 1R01AG036871, and the CHAMP Foundation.

## Author contributions

U.Z. performed most of the experiments and analyzed the results. S.R.B. performed mouse injections and helped interpret the results. J.S. and D.J. designed the ARCUS meganuclease that G.T. built. W.S. performed the initial ARCUS specificity analysis. C.V.P. developed a cell line with high levels of mutant mtDNA. J.S. characterized and provided the mouse model. D.J. supervised the project at Precision. C.T.M. supervised the overall project and wrote the first draft with U.Z. All authors participated in editing of the manuscripts.

## Competing interests

The authors declare the following competing interests: W.S., J.S., G.T., and D.J. work at Precision BioSciences, which is researching and developing ARCUS technology, and may research, develop, and commercialize mitochondria-targeted ARCUS nucleases in the future. C.T.M., D.J., G.T., and W.S. are named in a joint patent application (Patent applicant- Precision BioSciences, Inc. and the University of Miami; application number: 63/178,269; status: pending) for mitochondria-targeted ARCUS nucleases with Precision BioSciences. Specific aspect of manuscript covered in patent application: ARCUS nuclease sequences and compositions for targeting mitochondria, including delivery vectors; Methods of modifying cells, Treating mitochondrial conditions in vivo using the disclosed ARCUS nucleases. All other authors declare no competing interests.

**Additional information**

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23561-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to C.T.M.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Yong-Sam Kim and David Thorburn for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

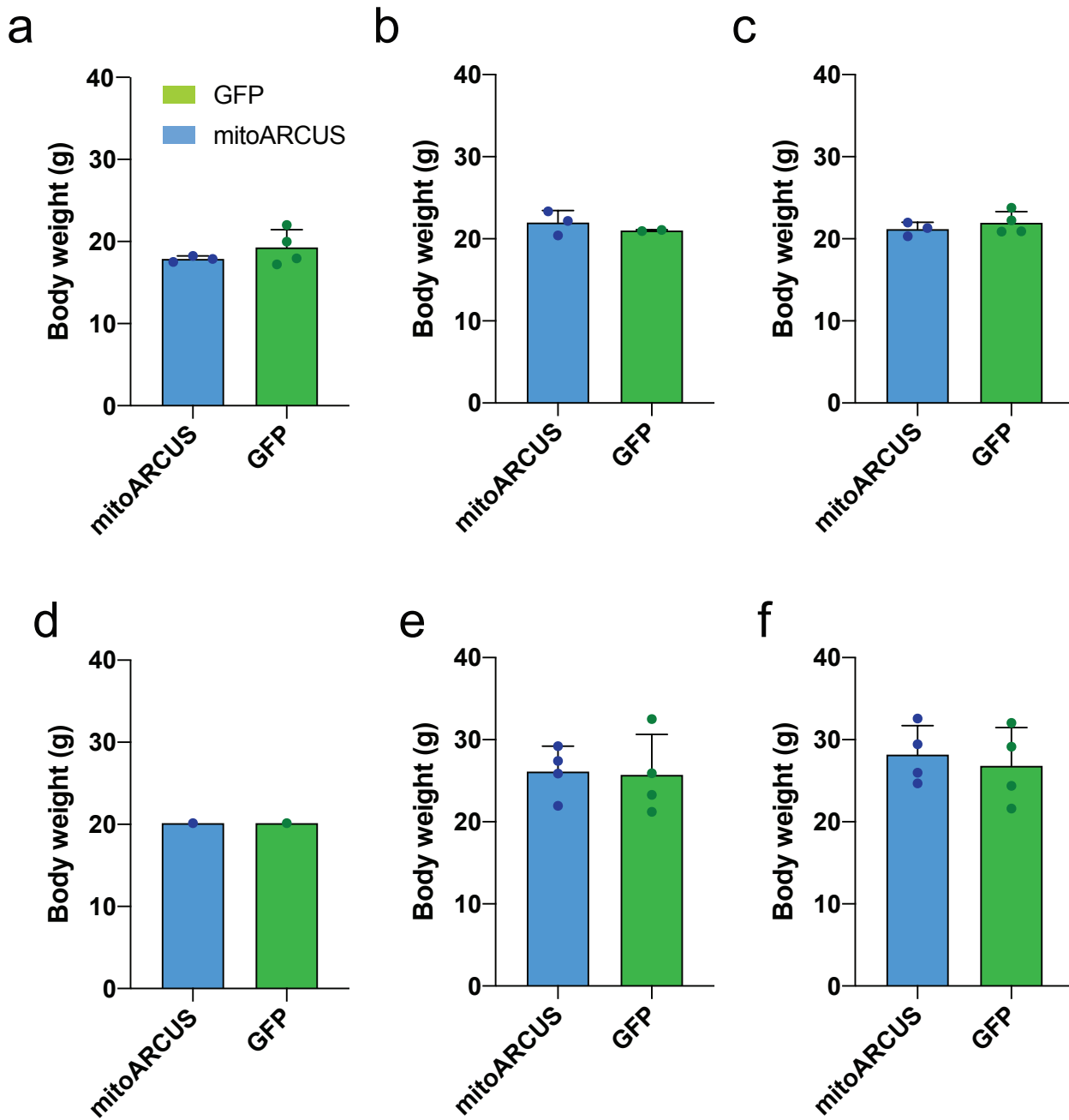
**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



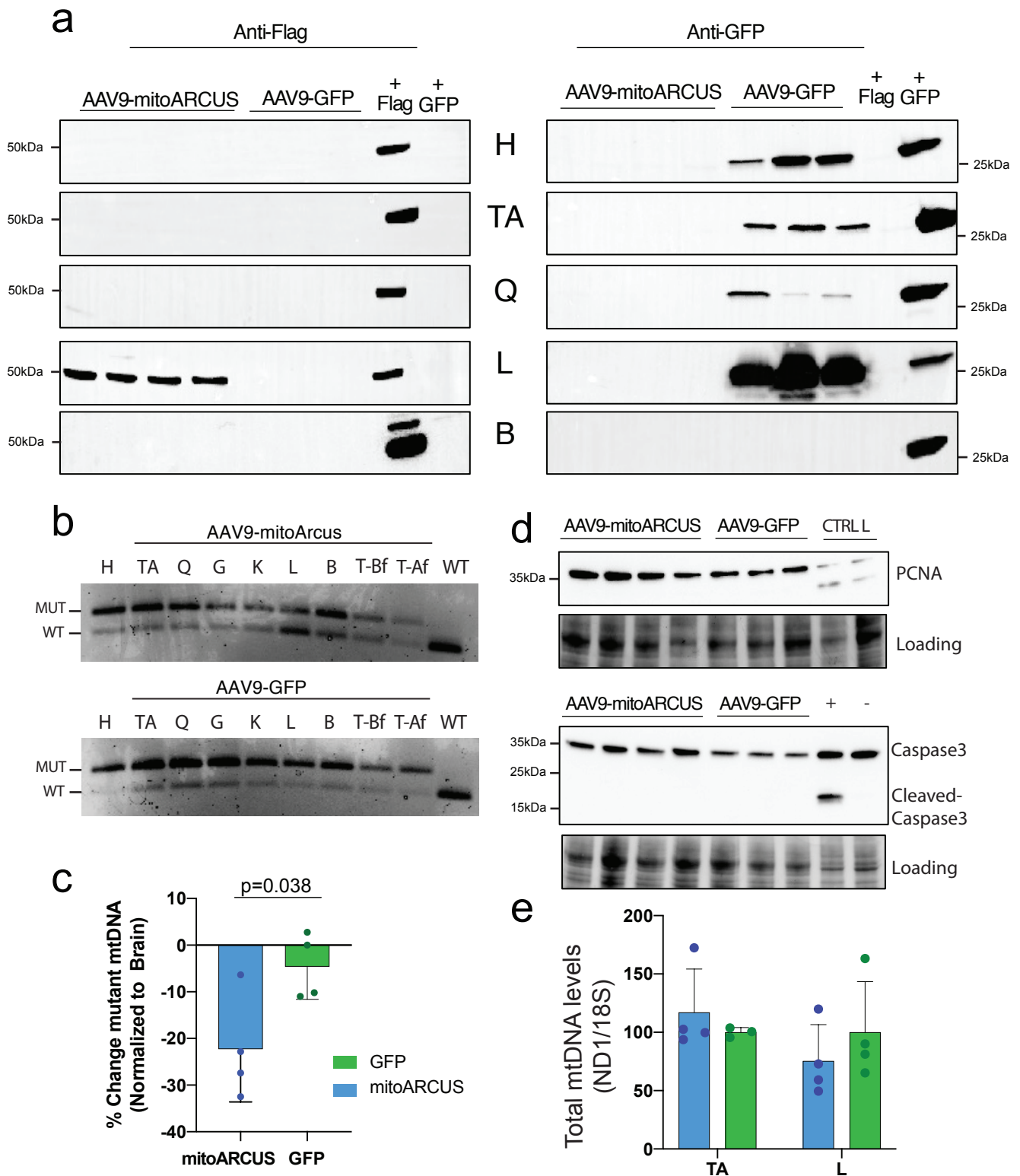
**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

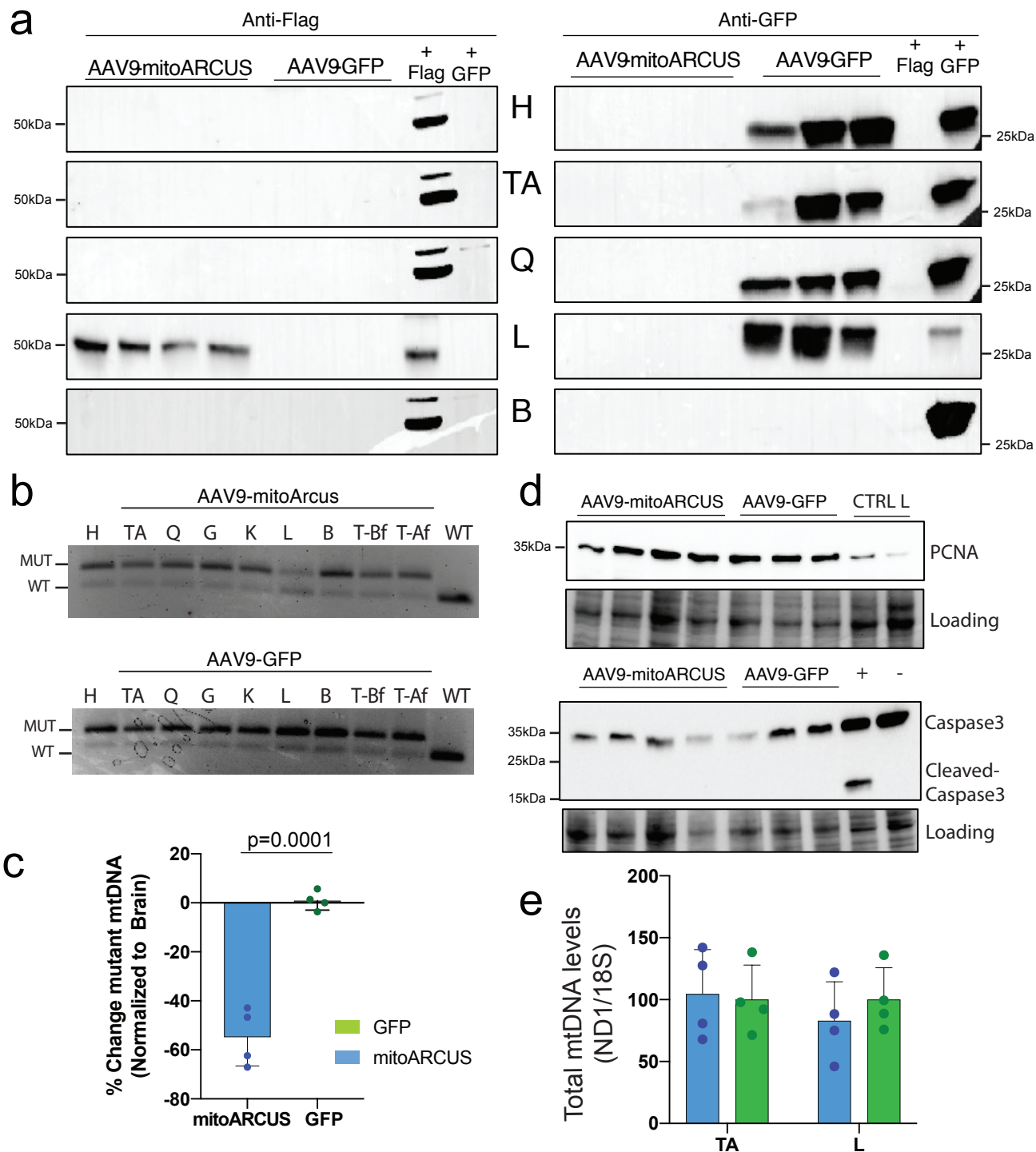


**Supplementary Fig S1: Mouse weights of injected animals at 6, 12, and 24 weeks PI.**

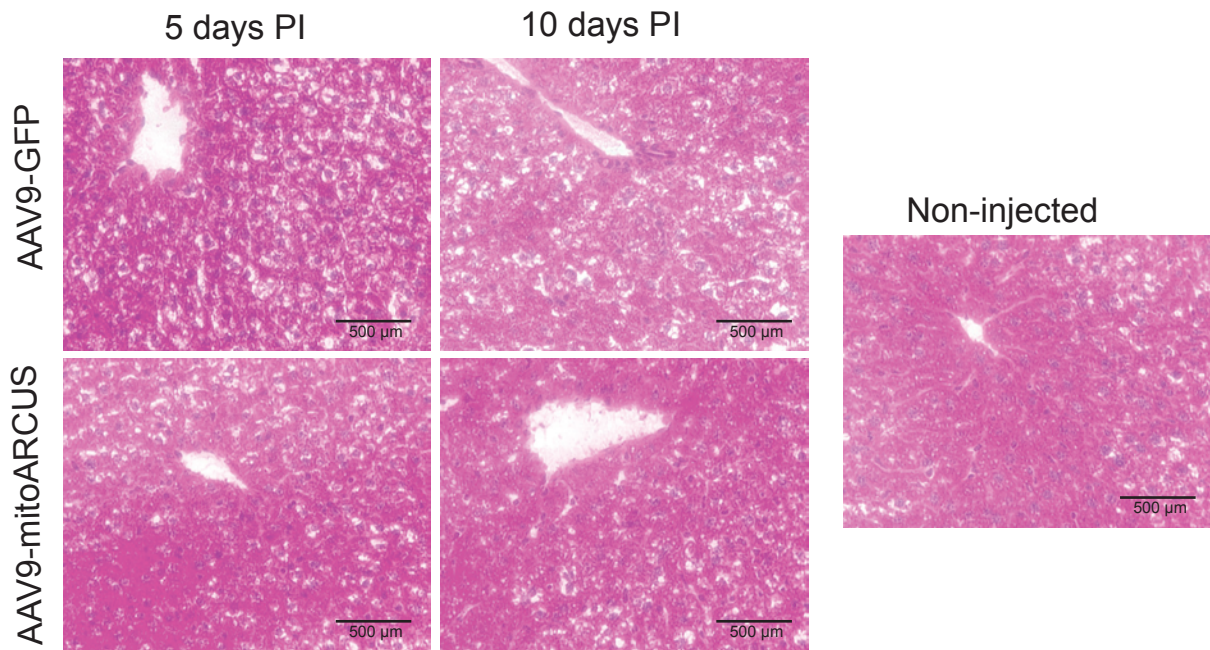
Body weights (grams) of mice injected at 2.5 weeks and sacrificed at (a) 6 weeks PI (n=3 mitoARCUS, n=4 GFP), (b) 12 weeks PI (n=3 mitoARCUS, n=2 GFP), and (c) 24 weeks PI (n=3 mitoARCUS, n=4 GFP). Body weights of mice injected at 6 weeks and sacrificed at (d) 6 weeks PI (n=1), (e) 12 weeks PI (n=4), and (f) 24 weeks PI (n=4). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed student's t-test when  $n \geq 3$ .



**Supplementary Fig S2: AAV9-mitoARCUS effect in young treated mice 5 days Post Injection** a) Western blots of homogenates probed with Flag antibody for AAV9-mitoARCUS and GFP for AAV9-GFP samples for heart (H), tibialis anterior (TA), quadriceps (Q), liver (L) and brain (B). This experiment was repeated twice with similar results. b) Representative RFLP analysis of DNA samples from an animal injected with AAV9-mitoARCUS and an animal injected with AAV9-GFP 5 days PI in heart (H), tibialis anterior (TA), quadriceps (Q), gastrocnemius (G), kidney (K), liver (L), brain (B), tail before injection (T-Bf), and tail after injection (T-Af). This analyses was performed for each animal. c) Quantification of heteroplasmy shift shown as percent change in heteroplasmy in liver, normalized to brain tissue, from results obtained with RFLP “last cycle hot” PCR analysis (n=4). d) Western blots of liver homogenates of animals injected with AAV9-mitoARCUS (n=4) and AAV9-GFP (n=3). Expression of PCNA shown in blot with control livers from healthy adult mice. Expression of Caspase3 and Cleaved-Caspase3 shown in blot with positive control representing MEFs treated with staurosporine, negative control representing MEFs not treated with staurosporine. Blots are shown along with total protein loading. This experiment was repeated twice. e) Quantification by qPCR of total mtDNA levels were measured in liver (L) and tibialis anterior (TA) at 5 days PI using ND1 mitochondrial primer/probes normalized to 18S (nuclear DNA). n=4, with exception of AAV9-GFP-injected TA (n=3). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed student’s t-test.



**Supplementary Fig S3: AAV9-mitoARCUS effect in young treated mice 10 days Post Injection** a) Western blots of homogenates probed with Flag antibody for AAV9-mitoARCUS and GFP for AAV9-GFP samples for heart (H), tibialis anterior (TA), quadriceps (Q), liver (L) and brain (B). This experiment was repeated twice. b) Representative RFLP analysis of DNA samples from an animal injected with AAV9-mitoARCUS and an animal injected with AAV9-GFP 10 days PI in heart (H), tibialis anterior (TA), quadriceps (Q), gastrocnemius (G), kidney (K), liver (L), brain (B), tail before injection (T-Bf), and tail after injection (T-Af). This analyses was performed for each animal. c) Quantification of heteroplasmy shift shown as percent change in heteroplasmy in liver, normalized to brain tissue, from results obtained with RFLP “last cycle hot” PCR analysis. d) Western blots of liver homogenates of animals injected with AAV9-mitoARCUS (n=4) and AAV9-GFP (n=3). Expression of PCNA shown in blot with control livers from healthy adult mice. Expression of Caspase3 and Cleaved-Caspase3 shown in blot with positive control representing MEFs treated with staurosporine, negative control representing MEFs not treated with staurosporine. Blots are shown along with total protein loading. This experiment was repeated twice. e) Quantification by qPCR of total mtDNA levels were measured in liver (L) and tibialis anterior (TA) at 10 days PI using ND1 mitochondrial primer/probes normalized to 18S (nuclear DNA). Data are mean  $\pm$  SEM of n=4. Statistical analysis was performed using two-tailed student’s t-test.



**Supplementary Fig S4: Liver histology at 5 and 10 days PI** Liver samples were embedded in OCT and snap-frozen. Samples were sliced to 7μm thickness and stained for H&E. Bar= 500μm. This experiment was repeated twice with identical results.