



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Tesi doctoral

Programa de doctorat de Bioquímica, biologia molecular i biomedicina

TERÀPIA GÈNICA BASADA EN UN VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT PER AL TRACTAMENT D'UN MODEL DE RATOLÍ D'ATÀXIA DE FRIEDREICH

Eudald Balagué Cabasés

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

2020



Universitat Autònoma
de Barcelona

Tesi doctoral

Programa de doctorat de Bioquímica, biologia molecular i biomedicina

**TERÀPIA GÈNICA BASADA EN UN
VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT PER
AL TRACTAMENT D'UN MODEL DE
RATOLÍ D'ATÀXIA DE FRIEDREICH**

Candidat a doctor

Eudald Balagué Cabasés

Directors de tesi

Dr. Antoni Matilla Dueñas

Dra. Ivelisse Sánchez Díaz

Tutora

Dra. Anna Bassols Teixidó

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

2020

AGRAÏMENTS

Finalment ha arribat el final d'aquesta etapa i m'agradaria agrair a totes les persones que durant aquests anys m'han ajudat i han contribuït d'alguna manera a la realització d'aquesta tesi. Evidentment voldria tenir unes paraules d'agraïment per cadascuna d'elles, però la llista és tant llarga que aquest apartat acabaria sent el més llarg de la tesi. Per això, intentaré ser breu, sense deixar-me ningú.

En primer lloc vull donar les gràcies al Dr. Antoni Matilla i la Dr. Ivelisse Sánchez per haver-me donat la oportunitat de realitzar la tesi doctoral, pels coneixements que m'heu transmès al llarg d'aquesta etapa i per tota la dedicació, esforç, entusiasme i inesgotable energia que us caracteritzen.

M'agradaria agrair a tots els companys de laboratori amb qui he compartit aquest llarg camí, però especialment al Dani, la Kerrie i a l'Àlex, que m'heu ajudat cada dia i heu contribuït a la realització d'aquest estudi. També al Marc i al Xavi, perquè entre tots heu creat un gran ambient de treball, que a banda de compartir coneixements, la vostra companyia ha amenitzat el dia a dia.

Gràcies a les persones, pacients i familiars, i entre elles a la Maria Pino, que s'han involucrat i han col·laborat dins de STOP-FA, per recollir fons per poder iniciar i tirar endavant aquest projecte i que per part meva el millor retorn que us puc donar ha estat la meva dedicació plasmada en aquesta tesi amb els prometedors resultats obtinguts per apropar-nos una mica més a la cura d'aquesta malaltia.

Agrair a tota la gent que científicament ha aportat el seu gra de sorra per desenvolupar aquest estudi. Al Dr. Jaume Coll per ser el meu mentor en electrofisiologia, a la Dra. Assumpció Bosch i Dra. Belén García per la realització de les administracions intratecals i el seu assessorament científic. Al Dr. Miguel Chillón pels coneixements aportats en qüestió de virus adenoassociats. A la Dra. Ana J. Pérez i Dra. Eva Pereiro per ajudar-me a realitzar l'estudi de la ultraestructura subcel·lular en el sincrotró ALBA. A la Dra. Grazia Isaya per haver-nos donat l'anticòs que s'ha utilitzat en aquesta tesi per detectar la frataxina. I al Dr. Javier Martínez Picado i Mari Carmen Puertas per permetre realitzar l'estudi amb *ddPCR*.

A la Dra. Gemma Guillazo per la seva implicació en el meu cas, i a la Dra. Anna Bassols, per acceptar-me en el programa de doctorat i ajudar-me en el dipòsit d'aquesta tesi. Sense elles no hagués estat possible. Als membres de la comissió de seguiment Dr. Jose Ramon Bayascas, Dr. Jesus Giraldo i Dr. Miquel Vila, pels consells que m'heu donat i marcar-me el camí a seguir.

Fora de l'àmbit laboral, m'agradaria donar les gràcies a les moltes persones que han estat al meu costat al llarg d'aquests anys, ja que tot i no haver participat científicament, són una part molt important de la meua vida i segur que no hagués arribat fins on estic sense elles.

A la meua família, especialment a la meua mare, el meu pare, al Gerard i la Míriam, a la padrina i al padrí, que tot i que ja no hi és, sé que estaria molt orgullós. Gràcies per haver estat els pilars que m'han ajudat a construir-me com a persona, per preocupar-vos per mi en tot moment, per procurar que mai em faltes res, per preguntar que tal el doctorat, tot i no entendre molt bé el que faig, i la llista seguiria infinitament perquè us ho dec tot. Espero que estigueu orgullosos, com jo ho estic de vosaltres.

A l'Ariadna, gràcies per haver compartit aquest "viatge" amb mi, per haver estat present sempre que ho he necessitat, per tenir la paciència d'aguantar-me sobretot en els moments difícils i per haver cregut sempre en mi. Tenir-te al meu costat m'ha donat la força necessària per no defallir i arribar fins al final. Espero que el pròxim viatge també el vulguis fer amb mi. I també voldria agrair-li a la teua família, sobretot als teus pares, per també haver-se preocupat tot aquest temps.

Per acabar, agrair als meus amics Alex, Maria, Aleix, Mar, Roger, Mari Carmen, Carla, Joan i Judit, pels bons moments que hem passat junts, que m'han ajudat tantes i tantes vegades a desconnectar i en definitiva per haver-me deixat formar part de la vostra vida. Vull que sapigueu que per mi és un plaer ser amic vostre i espero seguir vivint més bons moments junts. A les meravelloses amistats forjades durant aquest temps, Vicenç, Vero, Arce, Lucía, Ana perquè a part d'haver compartit mútuament la duresa d'aquesta etapa, hem tingut moments magnífics de diversió, de "petaos" i "rebetats". I no em voldria oblidar dels amics de la universitat, David, Sandra, Adrià, Marcos, Esther, Rocío, gràcies perquè tot i haver-se separat els nostres camins ja fa un temps, em mantingut l'amistat i hem continuat compartint experiències.

TAULA DE CONTINGUTS

ABREVIACIONS	1
RESUM	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓ	8
1. Atàxia de Friedreich.	9
2. Història.....	9
3. Epidemiologia.....	10
4. Aspectes clínics i simptomatologia.....	11
5. Fisiopatologia.....	13
6. Diagnòstic i monitorització.....	16
7. Causa genètica.	17
8. Estructura i regulació del gen <i>FXN</i>.....	21
9. La proteïna frataxina.....	23
9.1. Expressió i localització.	24
9.2. Estructura.....	25
9.3. Maduració i isoformes.	26
9.4. Funció.	27
9.4.1. Homeòstasi del ferro.	27
9.4.2. Regulació de mecanismes antioxidants.....	30
9.4.3. Donador d'electrons a cadena respiratòria.	31
10. Conseqüències del dèficit de frataxina a nivell cel·lular.....	31
11. Models experimentals de l'atàxia de Friedreich.	32
11.1. Models de llevat.....	33
11.2. Models cel·lulars.	34
11.3. Models invertebrats.	36

11.4. Models de ratolí.	37
11.4.1. Model de ratolí YG8R.....	42
12. Aproximacions terapèutiques.	44
12.1. Millora la funció mitocondrial i reduir l'estrès oxidatiu.....	45
12.2. Modulació de les vies metabòliques controlades per la frataxina.....	47
12.3. Substituts, estabilitzadors i potenciadors de la proteïna frataxina.	48
12.4. Increment de l'expressió del gen <i>FXN</i>	49
12.5. Teràpia gènica.....	50
12.6. Teràpia cel·lular.....	53
13. Teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats.....	53
13.1. Els vectors virals adenoassociats.	55
13.1.1. Estructura i biologia dels virus adenoassociats.	55
13.1.2. Característiques dels vectors recombinants AAV.	58
13.2. Vies d'administració.....	61
13.2.1. Administració sistèmica.	62
13.2.2. Administració directa al sistema nerviós.	63
13.3. El transgèn.	65
13.4. Seguretat de la teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats.	67
13.5. Èxit de la teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats.....	69
OBJECTIUS.....	71
MATERIALS I MÈTODES	73
1. Caracterització del gen <i>FXN</i> i la proteïna frataxina.....	74
2. Caracterització de la patologia a l'atàxia de Friedreich.....	74
2.1. Obtenció de mostres de pacients amb atàxia de Friedreich i familiars portadors i no portadors.	74
2.1.1. Extracció d'ADN i ARN de sang.....	74
2.1.2. Biòpsia de pell per obtenir un cultiu primari de cèl·lules fibroblasts.....	75
2.2. Quantificació dels nivells d'expressió d'ARNm de <i>FXN</i> de pacients amb atàxia de Friedreich.....	75
2.2.1. Obtenció d'ARN i anàlisi de la integritat i puresa.	75
2.2.2. Digital-droplet PCR.	76
2.2.3. PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).	77

2.3. Criomicroscòpia tomogràfica de raigs X a partir de llum de Sincrotró.	78
3. Model de ratolí amb atàxia de Friedreich.	80
3.1. Establiment i manteniment de la colònia de ratolins.	80
3.2. Genotipatge.	82
3.2.1. Extracció d'ADN de la cua de ratolins.	82
3.2.2. PCR per comprovar el fons genètic <i>knock-out</i> pel gen <i>Fxn</i>	82
3.2.3. Quantificació del número de còpies del transgèn.	83
3.2.4. TP-PCR basada en fluorescència.	83
3.2.5. PCR per comprovar el número de repeticions GAA.	84
4. Generació de vectors d'expressió de frataxina.	85
4.1. Clonatge.	85
4.2. Transformació en cèl·lules bacterianes competents.	86
4.3. Comprovació de l'eficiència del clonatge.	87
4.3.1. Electroforesi en gel d'agarosa.	88
4.3.2. Seqüenciació per <i>Sanger</i>	88
5. Avaluació de l'expressió de frataxina recombinant humana dels vectors d'expressió sintetitzats en cultiu cel·lular <i>in vitro</i>.	88
5.1. Cultius cel·lulars.	88
5.2. Western-blot.	89
6. Producció i purificació dels vectors virals recombinants adenoassociats.	91
7. Administració única intratecal dels vectors virals adenoassociats (rAAV9) en els ratolins.	91
8. Bioluminescència <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i>.	93
9. Avaluació de l'expressió de frataxina recombinant en els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.	93
9.1. PCR quantitativa amb retrotranscripció a temps real (qRT-PCR).	93
9.2. Western-blot de teixits de ratolí.	95
10. Tests de neurocomportament per a l'avaluació fenotípica dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.	96
10.1. Electrofisiologia del nervi caudal.	96
10.2. Test del rotarod accelerat.	97

10.3. Reflex d'agafada (hindlimb clasping reflex).....	98
10.4. Anàlisi de la petjada (<i>footprint analysis</i>).....	98
10.5. Determinació del pes.....	99
11. Dissecció i obtenció dels teixits dels ratolins.....	99
12. Avaluació de la neuropatologia dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	100
12.1. Histologia.....	100
12.1.1. Tinció hematoxilina & eosina (H&E).....	101
12.1.2. Tinció Nissl.....	101
12.1.3. Tinció de Perls.....	101
12.1.4. Immunohistoquímica.....	102
12.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).....	103
13. Anàlisi de la funció mitocondrial de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	103
13.1. Aïllament de la fracció mitocondrial.....	103
13.2. Assaig d'activitat dels complexos I i II de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria.....	103
13.3. Determinació dels nivells d'ATP basals.....	104
13.4. Avaluació de l'estrès oxidatiu.....	105
14. Estadística.....	105
RESULTATS.....	106
Capítol I: Caracterització genètica i molecular de l'atàxia de Friedreich.107	
1. Caracterització del gen <i>FXN</i> i la proteïna frataxina.....	108
1.1. Estudi de l'evolució filogenètica del gen <i>FXN</i> i la proteïna frataxina.....	108
1.2. Predicció d'elements reguladors en el gen <i>FXN</i>	110
1.3. Comparació entre la frataxina humana i ratolí.....	113
2. Estudi de l'expressió d'ARNm i proteïna frataxina en pacients amb atàxia de Friedreich.....	115
2.1. Nivells d'expressió d'ARNm de <i>FXN</i> de cèl·lules de pacients amb FRDA.....	115
2.2. Nivells d'expressió de la proteïna frataxina en cèl·lules de pacients amb FRDA..	118

2.3. Estudi de l'expressió de frataxina en teixits neurològics d'un pacient amb FRDA.....	120
3. Caracterització de la patologia mitocondrial en l'atàxia de Friedreich.....	121
3.1. Avaluació de la funció mitocondrial i de l'estrès oxidatiu en cèl·lules de pacients amb FRDA.....	121
3.2. Avaluació de la ultraestructura i la morfologia de cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA mitjançant criomicroscòpia tomogràfica de raigs X.	124
Capítol II: Estratègia de teràpia gènica.....	129
1. Model de ratolí YG8R amb atàxia de Friedreich.....	130
1.1. Genotipatge.....	130
1.1.1. <i>Fxn</i> endogen murí.	130
1.1.2. Quantificació del número de còpies del transgèn.....	131
1.1.3. Quantificació del número de repeticions GAA.	132
2. Generació de vectors d'expressió de la proteïna frataxina.	135
3. Producció dels vectors virals adenoassociats recombinants (rAAV9).	142
4. Disseny experimental per a l'avaluació del tractament de teràpia gènica en el model de ratolí YG8R amb atàxia de Friedreich.....	144
Capítol III: Avaluació de la biodistribució i expressió de frataxina que proveeix una administració intratecal del vector rAAV9-FXN en ratolins YG8R.....	146
1. Anàlisi de la biodistribució dels vectors virals rAAV9 en ratolins amb una única administració intratecal.	147
2. Avaluació de l'expressió de frataxina recombinant en ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	151
2.1. Quantificació dels nivells d'ARNm de frataxina.....	152
2.2. Biodistribució de l'expressió de proteïna frataxina recombinant.	155
2.3. Avaluació de la durada de l'expressió de proteïna frataxina recombinant.	158
2.4. Quantificació dels nivells d'expressió de la proteïna frataxina recombinant.	159
Capítol IV. Avaluació de l'eficàcia terapèutica del tractament de teràpia gènica en els ratolins YG8R.	162

1. Avaluació del fenotip motor i sensitiu dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	163
1.1. Avaluació de la polineuropatia sensitiva perifèrica mitjançant electrofisiologia del nervi caudal.....	164
1.2. Avaluació de la coordinació motora i l'atàxia amb rotarod accelerat.....	167
1.3. Avaluació del reflex d'agafada.....	169
1.4. Avaluació de la marxa mitjançant l'anàlisi de la petjada.....	171
1.5. Quantificació de l'índex fenotípic.....	173
1.6. Monitorització del pes.....	175
2. Avaluació de la neuropatologia i cardiomiopatia dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	176
2.1. Anàlisi de les neurones dels ganglis de l'arrel dorsal.....	176
2.2. Anàlisi de les neurones del nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal.....	179
2.3. Anàlisi de les neurones grans del nucli dentat del cerebel.....	180
2.4. Anàlisi ultraestructural de les arrels dorsals de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	181
2.5. Avaluació de la cardiomiopatia dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	183
3. Anàlisi de la funció mitocondrial del ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	185
3.1. Anàlisi de l'activitat dels complexos de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria.....	186
3.2. Avaluació de la capacitat de síntesi energètica.....	187
3.3. Anàlisi de l'estrès oxidatiu.....	189
DISCUSSIÓ.....	191
Identificació de nous llocs potencials de regulació del gen FXN.....	193
Determinació dels nivells de frataxina necessaris per obtenir un efecte terapèutic.....	193
Determinació de biomarcadors moleculars patològics per a l'avaluació de l'eficàcia del tractament de teràpia gènica.....	194

Alteracions morfològiques i estructurals de les mitocòndries mitjançant criomicroscòpia tomogràfica de raigs X.....	194
Generació d'un nou vector de teràpia gènica AAV per tractar l'atàxia de Friedreich.	196
Biodistribució <i>in vivo</i> dels vectors virals rAAV9 amb una administració intratecal en els ratolins YG8R.	199
Increment dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina en teixits de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.	201
Àmplia biodistribució i expressió robusta i de llarga durada de la proteïna frataxina recombinant obtinguda en els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.	202
Prevenició de l'afectació fenotípica sensoriomotora dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	205
Prevenició de la neuropatologia i la cardiomiopatia en els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.....	208
Prevenició de la disfunció mitocondrial del ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.	211
CONCLUSIONS	212
BIBLIOGRAFIA	215

ABREVIACIONS

4-HNE: 4-Hidroxinonenal	DCIP: 2,6-diclorofenol indofenol
aa: Aminoàcids	ddPCR: <i>Droplet digital PCR</i>
AAV: Virus adenoassociat	DMEM: Medi de cultiu Eagle de Dulbecco modificat
ABC: Complex avidina-biotina	DN: Nucli dentat
ADN: Àcid desoxiribonucleic	dNTP: Deoxinucleòtid trifosfat
ADNc: ADN complementari	DPX: Dibutilftalat poliestirè de xilè
ApoB: Apolipoproteïna B	DRG: Ganglis de l'arrel dorsal
ARN: Àcid ribonucleic	DTT: Ditiotreitòl
ARNi: ARN d'interferència	EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic
ARNm: ARN missatger	EF1- α : Factor d'elongació 1 alfa
ARNmi: microARN	eFXN: Frataxina endògena
ARNsh: ARN de forquilla curta	EGTA: Àcid egtazic
ATP: Adenosina trifosfat	ELA: Esclerosi lateral amiotròfica
ATP5H: Subunitat d de l'ATP sintasa	EMG: Electromiograma
B2M: Beta-2-microglobulina	EPO: Eritropoetina
bGH PA: Senyal de poliadenilació de la hormona de creixement bovina	ETC: Cadena transportadora d'electrons
CAG: Promotor sintètic constituït per l'element potenciador del CMV; promotor, exó1 i intró 1 de la beta-actina de gallina; i l'acceptor d'empalmament del gen beta-globina de conill	FAM: Amidita de fluoresceïna
CMV: Citomegalovirus	FARS: Escala de classificació d'atàxia de Friedreich
CRISPR: Repeticions palindròmiques curtes agrupades i regularment interespaïades	FDA: Administració d'aliments i medicaments dels Estats Units
DAB: 3,3'-diaminobenzidina	Fe-S: Ferro-sofre
	FGFR: Receptor del factor de creixement de fibroblast

Fh: Frataxina homòloga de mosca	Kb: Kilobase
FRDA: Atàxia de Friedreich	kDa: Kilodaltons
Fw: <i>Forward</i>	KI: <i>Knock-in</i>
FXN: Frataxina	KO: <i>Knock-out</i>
GAPDH: Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa	LamR: Receptor laminina
G-CSF: Factors estimulants de granulòcits	LB: Medi Luria Bertani
GFAP: Proteïna àcida fibril·laria glial	LCR: Líquid cefalorraquidi
GFP: Proteïna fluorescent verda	LNP: Nanopartícules lipídiques
GUSB: Beta-glucuronidasa	LOFA: Atàxia de Friedreich d'aparició tardana
gv: Genoma viral	LUC: Luciferasa <i>firefly</i> de la cuca de llum
HA: Hemaglutinina	MCK: Creatina quinasa de múscul
HDACi: Inhibidors de la deacetilació d'histones	MPP: Peptidasa de processament mitocondrial
HEK 293: Cèl·lules embrionàries de ronyó humanes	MPS: Mucopolisacaridosis
HEX: Hexacloro-fluoresceïna	mPTP: Porus transitori de permeabilitat mitocondrial
HRP: Enzim peroxidasa de rave	N2a: Cèl·lules neuroblastoma de ratolí
HSV: Virus Herpes Simple	NAbs: Anticossos neutralitzants
ICARS: Escala internacional de classificació cooperativa de l'atàxia	NFS1: Cisteïna desulfurasa
iPSCs: Cèl·lules mare pluripotents induïdes	NR1D1: Receptor nuclear de la subfamília 1 grup D 1
IRE: Elements sensibles al ferro	NRF1: Factor nuclear respiratori 1
IRP1: Aconitasa citosòlica	Nrf2: Factor 2 relacionat amb el factor nuclear eritroide 2
ISC: Centres Ferro-Sofre	nt: Nucleòtid
ISCU: Enzim acoblador de conglomerats de Fe-S	Oct-1: Octamer-1
ITR: Repeticions terminals invertides	pb: Parell de bases
	PBS: Tampó fosfat salí

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa	SIA: Àcid siàlic
PFA: Paraformaldehid	SNC: Sistema nerviós central
pFXN: Promotor del gen humà frataxina	SNP: Sistema nerviós perifèric
PGK: Fosfoglicerat quinasa 1	SOD1: Superòxid dismutasa 1
PoliA: Poliadenilació	SPF: Específica lliure de patògens
PONS: Protuberància del tronc encefàlic	SV40: Virus simi 40
PPAR- γ : Receptor activador de la proliferació de peroxisomes	SYN: Sinapsina 1
PPE: Preproencefalina	Ta: Temperatura d'anellament
PUFA: Àcid gras poliinsaturat	TALEN: Nucleasa efectora de tipus activador de la transcripció
qPCR: PCR quantitativa a temps real	TBP: Proteïna d'unió a TATA
qRT-PCR: PCR quantitativa a temps real amb retrotranscripció	TBS: Tampó tris salí
rAAV: Vector viral adenoassociat recombinant	TEM: Microscòpia electrònica de transmissió
rFXN: Frataxina recombinant	Tg/-: Transgènic hemizigot
RIN: Número d'integritat d'ARN	Tg/Tg: Transgènic homozigot
rNSE: Enolasa específica neuronal de rata	TP-PCR: <i>Triplet repeat primed</i> PCR
ROS: Espècies reactives d'oxigen	TXM: Microscopi tomogràfic de raigs X
Rv: <i>Reverse</i>	UBC: Ubiquitina C
SARA: Escala per a l'avaluació i classificació de l'atàxia	UTR: Regió no codificant
SC: Medul·la espinal	VDAC1: Canal 1 d'anions dependent de voltatge
SCA: Atàxia espinocerebel·losa	WPRES: Element regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis de la marmota americana
SCF: Factors estimulants de cèl·lules mare	WT: Tipus salvatge
SDS: Dodecilsulfat sòdic	YAC: Cromosoma artificial de llevat
SEM: Error estàndard de la mitjana	Yfh1: Frataxina homòloga de llevat
SHSY-5Y: Cèl·lules neuroblastoma humanes	YY1: Yin Yang 1

RESUM

L'atàxia de Friedreich (FRDA) és una malaltia neurodegenerativa, hereditària autosòmica recessiva, causada per la deficiència de la proteïna frataxina (FXN) deguda a l'expansió patològica del triplet GAA intrònic en el gen *FXN*. Es caracteritza principalment per una atàxia progressiva, pèrdua sensorial i cardiomiopatia hipertròfica. La neurodegeneració s'identifica en les neurones dels DRG, els nervis sensorials perifèrics, les columnes posteriors i el nucli dentat cerebel·lós. En l'actualitat no existeix tractament, però diverses proves de concepte han evidenciat el potencial terapèutic de la teràpia gènica amb AAV per a la FRDA. No obstant, aquests estudis han utilitzat vies d'administració dels AAV ineficients per tractar la neurodegeneració i han utilitzat promotors sintètics que proporcionen nivells molt elevats de FXN. Dades recents assenyalen la importància de mantenir els nivells de frataxina dins d'un rang fisiològic a causa de la toxicitat cel·lular que ha demostrat la seva sobreexpressió.

En aquest estudi s'ha desenvolupat un nou vector de teràpia gènica AAV9 (rAAV9-FXN) amb una seqüència d'ADN que codifica per a la frataxina, regulada pel promotor hPGK1 i l'element WPRE. Una única administració intratecal de rAAV9-FXN en ratolins FRDA de 10 setmanes d'edat ha demostrat una àmplia biodistribució i transducció en els teixits neurològics afectats en la FRDA com els DRG, els nervis perifèrics, la medul·la espinal i també en els teixits sistèmics com el cor i el fetge. Aquesta estratègia de teràpia gènica proporciona una expressió de frataxina recombinant sostinguda i de llarga durada, amb nivells segurs, no tòxics, similars als nivells endògens de frataxina en ratolins WT durant 22 mesos després de l'administració. Els ratolins FRDA tractats amb rAAV9-FXN han demostrat la prevenció significativa de les característiques patològiques de la malaltia com la coordinació motora, els potencials d'acció sensitius dels nervis perifèrics, el reflex d'agafada, la neurodegeneració en els DRG, la medul·la espinal i el nucli dentat, juntament amb la correcció de la cardiomiopatia, la reducció de l'acumulació de dipòsits de ferro i la preservació de la funció mitocondrial mantenint l'activitat de la cadena de transport d'electrons.

En conclusió, aquest estudi demostra l'eficàcia terapèutica de l'administració intratecal del vector rAAV9-FXN per al tractament a nivell preclínic d'un model de ratolí amb la malaltia i proporciona evidència del potencial terapèutic per al tractament de l'atàxia de Friedreich.

ABSTRACT

Friedreich's ataxia (FRDA) is a recessive inherited neurodegenerative disease caused by frataxin (FXN) deficiency caused by the pathological intronic GAA expansion within the *FXN* gene. FRDA is characterised by progressive ataxia, sensory loss and hypertrophic cardiomyopathy. Neurodegeneration is identified in DRG neurons, peripheral sensory nerves, the posterior column, and cerebellar dentate nucleus. To date, there is no treatment available, but proof-of-concept approaches have highlighted the therapeutic potential of AAV-gene therapy in FRDA. However, these studies have used inefficient AAV delivery routes to treat the neurodegeneration, and used synthetic promoters providing high-yields of FXN levels. Recent data point to the importance of maintaining frataxin levels within a physiological range due to cellular toxicity that cause its overexpression.

In this study, a new AAV9-gene therapy vector (rAAV9-FXN) has developed including a DNA sequence that codify for frataxin regulated by the hPGK1 promoter and the WPRE element. A single intrathecal administration of rAAV9-FXN into ten-week-old FRDA mice has demonstrated a wide biodistribution and transduction into affected neurological tissues in FRDA like DRG, peripheral nerves, spinal cord, and also systemic tissues as liver and heart. This gene therapy strategy provides sustained and long-term frataxin expression, with safe non-toxic levels, similar to endogenous frataxin levels in the WT mice during 22 months after administration. rAAV9-FXN treated FRDA mice has demonstrated significant prevention of pathological characteristics of the disease as the motor coordination, the sensory action potentials of peripheral nerves, the hindlimb clasping reflex, prevents the neurodegeneration of the DRG, spinal cord and dentate nucleus, along with cardiomyopathy correction, reduction of iron deposits accumulation and preservation of mitochondrial function by maintaining the electron transport chain activity.

In conclusion, this study demonstrates the therapeutic efficacy of intrathecal administration of the rAAV9-FXN vector for the preclinical treatment of a mouse model with the disease and provides evidence for the clinical therapeutic potential for the treatment of Friedreich ataxia.

INTRODUCCIÓ

1. Atàxia de Friedreich.

L'atàxia de Friedreich (FRDA; OMIM #229300; ORPHA 95) és una malaltia neurodegenerativa hereditària autosòmica recessiva causada per la deficiència de frataxina com a resultat majorment d'una expansió GAA en homozigosi en el primer intró del gen *FXN*. La malaltia es caracteritza per atàxia sensorial i espinocerebel·losa progressiva, pèrdua sensorial, disàrtria, signes piramidals, i debilitat muscular. Altres símptomes presents inclouen escoliosi, cardiomiopatia hipertròfica i diabetis. A nivell neuropatològic s'identifica la pèrdua de les neurones en els ganglis de les arrels dorsals (DRG), fibres nervioses sensorials perifèriques, degeneració de les columnes posteriors de la medul·la espinal i pèrdua variable del nucli dentat en el cerebel. En l'actualitat no es disposa d'una teràpia efectiva per tractar, aturar o revertir la progressió dels signes clínics de l'atàxia de Friedreich.

2. Història.

La malaltia va ser descrita per primera vegada el 1863 per Nikolaus Friedreich, un neuròleg i patòleg alemany que l'anomenà atàxia de Friedreich (1). En els següents anys, va caracteritzar la malaltia com hereditària, descrivint-la com una atrofia degenerativa de les columnes posteriors de la medul·la espinal que condueix a l'atàxia progressiva, pèrdua sensorial, debilitat muscular, sovint associada a escoliosi, deformitat del peu i cardiomiopatia. El 1875, Wilhelm Erb, un estudiant de Nikolaus Friedreich, va descriure la pèrdua dels reflexos dels tendons com a característica clínica i patològica de la malaltia, que no havia identificat Friedreich prèviament (2,3). Aquesta nova malaltia va ser discutida com a tal dins la comunitat científica. Concretament, Charcot considerava que els pacients de Friedreich patien esclerosi múltiple i que la neurosífilis estava associada. Gowers va ser el primer neuròleg que va acceptar la nova identitat de la malaltia. Després de la mort de Friedreich, el mateix Charcot va identificar un jove que patia atàxia no tenia sífilis i reconeixia l'atàxia hereditària. Després d'això, Duchenne va afirmar l'existència de la nova malaltia. El 1882, Brousse va anomenar aquesta malaltia finalment com atàxia de Friedreich (abreviada FRDA) (4,5). El 1893, Pierre Marie, deixeble de Charcot, va separar la FRDA de les atàxies dominants (6). El 1907, Mott F.W. va descriure la degeneració del nucli dentat del cerebel i la va associar a la neuropatologia ja descrita de la malaltia (7). En la dècada de 1980s, Lamarche, va trobar grànuls de ferro acumulats en el cor de pacients amb la malaltia (8). El 1976, un grup del Quebec al Canadà, van proposar uns criteris essencials per al diagnòstic de la malaltia basats amb 50 casos de pacients (9). El 1981, Anita Harding, en un estudi amb 150 casos, tot i que estava d'acord amb les característiques essencials fixades pels canadencs per diagnosticar la malaltia va proposar que aquestes eren massa rígides i insuficients sobretot en la infantesa. Va establir doncs les característiques clíniques típiques de l'atàxia de Friedreich, on es

va especificar l'herència recessiva de la malaltia com a tret essencial per al diagnòstic, juntament amb l'aparició dels símptomes abans dels 25 anys, atàxia progressiva, absència de reflex als tendons de les cames, neuropatia sensitiva axonal i disàrtria (10,11) (**Taula 1**). El 1988 Chamberlain va realitzar el primer mapatge del gen *FRDA*, que va permetre determinar-ne el locus en el cromosoma 9, concretament a 9q13-q21.1, mitjançant un estudi de *linkage* amb 20 famílies amb almenys 3 germans afectes de la malaltia (12–14). Inicialment al gen *FRDA* se'l va anomenar X25 i el 1996, V. Campuzano, M. Koenig, M. Pandolfo van identificar la mutació genètica que causava la malaltia, van determinar la deficiència de la proteïna afectada que van anomenar frataxina i es va relacionar la seva funció amb el metabolisme del ferro (15). Els anys posteriors es va intentar desxifrar la funció de la proteïna frataxina, que es va relacionar amb l'homeòstasi de ferro, amb la deficiència de formació de complexos Fe-S, així com la deficiència de les proteïnes que requereixen els complexos Fe-S com són l'aconitasa i els complexos I, II, III de la cadena transportadora d'electrons en biòpsies endocardiàques de pacients amb FRDA (16,17). Tanmateix, s'ha demostrat que la falta de frataxina afecta la funció mitocondrial (18), afecta la fosforilació oxidativa (19) i incrementa l'estrès oxidatiu (20,21), entre d'altres. Malgrat aquests estudis, la funció exacta de la proteïna s'ha discutit fins l'actualitat i encara esdevé debat. Des de la identificació de la causa de la malaltia fins l'actualitat s'han dedicat molts esforços en trobar tractaments eficaços per curar els signes patològics, amb antioxidants, moduladors de l'homeòstasi del ferro, reguladors dels nivells de clústers Fe-S i de la funció mitocondrial, amb compostos que reemplacin o incrementin l'expressió del gen *FXN* o els nivells de frataxina, o de teràpia gènica amb diversos vectors (22). Malauradament cap d'ells ha esdevingut eficaç.

3. Epidemiologia.

L'atàxia de Friedreich és l'atàxia hereditària més freqüent. Afecta a homes i dones per igual i la incidència varia d'1 a 30.000-50.000 naixements vius. La prevalença de la malaltia varia depenent de la regió. En les poblacions occidentals, la prevalença de la FRDA varia entre 1:20.000 i 1:725.000. A l'Europa occidental la prevalença és entre 2 i 4 de cada 100.000 habitants (23,24). Als Estats Units afecta 1 de cada 50.000 persones. Els estudis epidemiològics han evidenciat un gradient de prevalença d'oest a est a Europa amb nivells més alts al nord d'Espanya, el sud de França, i Irlanda i nivells més baixos a Escandinàvia, l'est d'Alemanya, Àustria i Rússia. Les freqüències dels portadors en la població varien entre 1:55 (nord d'Espanya) i 1:336 (Rússia). L'anàlisi de l'haplotip del cromosoma Y humà apunten a l'origen de la població portadora de la FRDA a un refugi franco-càntabre de l'època glacial (6,25). La FRDA és poc freqüent en les poblacions de l'Àfrica subsahariana i molt poc freqüent a l'Extrem Orient. Al Japó, la taxa de prevalença de la FRDA és molt més rara (1:1.000.000) (26). En Orphanet, la prevalença s'indica com 1-9 en 100.000 a nivell mundial, el que concorda amb les dades europees.

4. Aspectes clínics i simptomatologia.

Els símptomes de l'atàxia de Friedreich comencen generalment entre els 5 i els 15 anys d'edat, però en ocasions infreqüents poden aparèixer tan precoçment com als 18 mesos o tan tard com als 50 anys d'edat (10,27). Es tracta d'un desordre multisistèmic, afectant el sistema nerviós perifèric i central, el sistema múscul-esquelètic, cardíac i endocrí. El primer símptoma que apareix és generalment la dificultat per caminar, o atàxia de la marxa (27). L'atàxia, caracteritzada per problemes de coordinació com ara moviments maldestres, inestabilitat i pèrdua d'equilibri, empitjora gradualment i es propaga lentament des de les extremitats inferiors, a les superiors i finalment al tronc. Poden ser signes precoços de la malaltia les deformitats en els peus, com ara el peu bot, també anomenat pes cavus; la flexió o duplicitat involuntària dels dits dels peus, els dits dels peus en martell, o inversió del peu (gir cap a dins) que es presenten en un 58,8% dels pacients. Amb el temps, els músculs comencen a afeblir-se i a consumir-se, especialment en els peus, cames i mans, i es desenvolupen les deformitats. Un 73,5% de les persones amb atàxia de Friedreich desenvolupa escoliosi, una curvatura anormal de la columna vertebral, que en cas de ser greu, pot afectar la respiració (28,29). Els pacients tenen polineuropatia perifèrica, caracteritzada per la pèrdua gradual de la sensació a les extremitats, sobretot inferiors, que pot propagar-se a altres parts de el cos, i que es manifesta per la pèrdua dels reflexos tendinosos, especialment als genolls i els turmells. En un 90% dels pacients aproximadament entre els 2 i 5 anys després de l'aparició dels primers símptomes es desenvolupa la disàrtria, consistent en un llenguatge lent, interromput i arrossegant les paraules. Posteriorment, apareix la disfàgia, que és la dificultat per engolir, característica avançada de la malaltia (28). El pacient es cansa amb facilitat. Els moviments ràpids, rítmics i involuntaris dels ulls anomenats nistagmes són comuns en un 90,5% dels casos (30). Altres símptomes que es poden donar són el dolor toràcic, la dificultat respiratòria i les palpitations. Aquests símptomes són el resultat de diverses formes de malaltia cardíaca que sovint acompanyen l'atàxia de Friedreich, concretament en un 40,3% dels pacients, com són la cardiomiopatia hipertròfica, consistent en la dilatació i conseqüent augment del volum del ventricle esquerra; i la fibrosi del miocardi, en la qual els músculs del cor es tornen fibrosos, ambdós conduint a una insuficiència cardíaca (30). Les anormalitats del ritme cardíac com la taquicàrdia, consistent en un increment de la freqüència cardíaca, i el bloqueig cardíac, és a dir, el deteriorament de la conducció d'impulsos cardíacs dins del cor, també són comuns. Entre el 20-49% de les persones amb atàxia de Friedreich desenvolupa intolerància als hidrats de carboni i al voltant d'entre el 7-30% desenvolupa diabetis mellitus (27-29,31-33). Alguns pacients poden desenvolupar la pèrdua d'audició, entre un 13-20%; i aproximadament el 36,8% manifesten una reducció de l'agudesesa visual (29).

La velocitat d'evolució de la malaltia varia d'una persona a una altra. Generalment entre 10 i 20 anys després de l'aparició dels primers símptomes, la persona resta confinada a una cadira de

rodes, i en etapes posteriors de la malaltia els individus es tornen totalment incapacitats. L'expectativa de vida pot estar afectada, moltes persones amb atàxia de Friedreich moren en l'edat adulta, aproximadament de mitjana als 40 anys, a causa de la malaltia cardíaca associada, la causa de mort més comuna, en aproximadament el 60% dels casos, però també degut a problemes respiratoris o coma diabètic (34–36). No obstant això, l'esperança de vida s'ha allargat en els darrers anys, degut a l'aparició de tractaments per pal·liar la cardiomiopatia com per exemple l'idebenona. Actualment, algunes persones amb símptomes menys greus d'atàxia de Friedreich poden viure fins als 60 o 70 anys.

Criteri per al diagnòstic típic de l'atàxia de Friedreich segons Harding

Primari (essencial per al diagnòstic)

Herència autosòmica recessiva
 Edat d'aparició de la simptomatologia abans dels 25 anys
 Atàxia progressiva en les extremitats i la marxa
 Absència dels reflexos tendinosos de les cames
 Reflex plantar extensor
 Neuropatia sensorial axonal
 Disàrtria (5 anys després de l'aparició)

Secundari (signes addicionals presents en més del 66% dels casos)

Escoliosis
 Debilitat piramidal a les extremitats inferiors
 Absència de reflexos en les extremitats superiors
 Pèrdua distal de la posició i sentit de vibració.
 Electrocardiograma anormal (cardiomiopatia)

Adicional (signes addicionals presents en menys del 50% dels casos)

Nistagmes
 Atròfia òptica
 Sordesa
 Amiotròfia distal (debilitat muscular)
 Peu bot o Pes cavus
 Intolerància a la glucosa o diabetis

Taula 1. Criteri diagnòstic per a determinar l'atàxia de Friedreich típica segons Harding, 1981 (10,37).

Únicament el 75% dels pacients d'atàxia de Friedreich segueixen el criteri de la malaltia típica definit per Harding. La resta, el 25% dels pacients amb FRDA presenten una manifestació atípica caracteritzada per una edat d'inici dels símptomes tardana i una progressió més lenta de la malaltia. Els casos on els símptomes apareixen després dels 25 anys s'anomenen *late-onset* (LOFA), i *very late-onset* (VLOFA) per als casos d'aparició després dels 40 anys d'edat (27,38,39). Alguns símptomes no neurològics com la cardiomiopatia, la diabetis o les deformacions esquelètiques són menys freqüents i el fenotip és sovint més espàstic amb una lleu atàxia.

5. Fisiopatologia.

La principal afectació en l'atàxia de Friedreich és la neuropatologia. Aquesta, a diferència de les altres atàxies hereditàries, es caracteritza per alteracions majoritàriament en tot el tracte sensorial des dels nervis perifèrics fins al cerebel (28). La neurodegeneració s'inicia en el sistema nerviós perifèric, concretament en els nervis sensorials perifèrics i els ganglis de l'arrel dorsal (DRG), i continua en el sistema nerviós central amb la pèrdua de neurones grans sensorials del nucli dorsal de la columna de Clarke, la degeneració de les columnes posteriors, les vies espinocerebel·lars, els tractes corticospinals; i posteriorment, el nucli dentat del cerebel, normalment en estadis més avançats de la malaltia (28,34,40,41).

En l'atàxia de Friedreich la neuropatologia es caracteritza per una polineuropatia sensorial que s'inicia primerament en el sistema nerviós perifèric a través de la neurodegeneració dels nervis sensorials perifèrics i els DRG. En els nervis perifèrics sensorials es produeix la pèrdua d'axons i fibres grans mielinitzades (4,42,43). Biòpsies dels nervis surals de pacients amb FRDA han evidenciat aquesta polineuropatia axonal amb una reducció significativa de la densitat de les fibres grans mielinitzades, mentre que la densitat de les fibres petites mielinitzades pot ser normal o moderadament reduïda (44–46). Les alteracions electrofisiològiques en els nervis perifèrics inclouen una reducció severa o una pèrdua completa dels potencials d'acció dels nervis sensorials i una disminució lleugera de les velocitats de conducció nerviosa (47). Els esdeveniments cel·lulars que provoquen la pèrdua de les grans fibres mielinitzades inclouen la degeneració axial i la desmielinització, tant per part de les neurones com de les cèl·lules de Schwann (48). En els ganglis de l'arrel dorsal la neurodegeneració es caracteritza per la reducció de la mida de les neurones i l'aparició de nòduls residuals que deriven de les cèl·lules satèl·lit, i que comporten progressivament la pèrdua de les neurones grans sensorials. Concretament, s'ha identificat un defecte maduratiu en neurones específiques que romanen atrofiques i que posteriorment moren de manera retrograda i gradual. També s'ha vist una alteració del metabolisme del ferro tant en neurones grans com en les cèl·lules satèl·lit dels DRG (34,41,46,49,50).

La neuropatologia continua avançant pel sistema nerviós central, on la medul·la espinal mostra una pèrdua neuronal en el nucli dorsal de la columna de Clarke, atròfia dels tractes espinocerebel·losos, pèrdua de fibres mielinitzades en les columnes posteriors, atròfia del tracte corticoespinal lateral i menys freqüentment neurodegeneració en el tracte corticoespinal anterior (4,42,43). El nucli dorsal de la columna de Clarke rep els axons dels ganglis dorsals, conté els feixos sensitius i és un important centre de sinapsis per a la propiocepció inconscient. Les neurones d'aquesta columna envien la informació propioceptiva al cerebel. Els pacients d'atàxia de Friedreich tenen una pèrdua elevada de neurones grans en el nucli dorsal de la columna de Clarke afectant l'entrada propioceptiva al cerebel (34). Les columnes posteriors de la matèria

blanca de la medul·la espinal, formades pels fascicles gràcil o de Goll, i cuneïforme o de Burdach, es troben atrofiades. Aquestes columnes són les branques centrals dels axons de les neurones sensorials dels DRG. Aquests axons s'estenen formant els fascicles gràcil i cuneïforme conduint la sensibilitat posicional i vibratòria fins al bulb raquidi. Els pacients amb FRDA presenten desmielinització, pèrdua de fibres i gliosi fibril·lar intensa en les columnes posteriors, amb més afectació en el nucli gràcil que el cuneïforme, indicant que les fibres originades per neurones més distals es troben més afectades. Els tractes espinocerebel·losos que s'encarreguen d'enviar la informació sensorial al còrtex cerebel·lós també estan atrofiats, donant lloc juntament amb la neurodegeneració del nucli dorsal de la columna de Clarke i les columnes posteriors, a la pèrdua del sentit de posició, l'aparició de la vibració i l'eliminació dels reflexos (34). Els tractes motors corticospinals i piramidals constituïts per llargues extensions de fibres també es veuen atrofiats, sobretot en les zones distals, suggerint un procés de mort retrògrada i conduint a la debilitat muscular i respostes plantars extensores. La ressonància magnètica de la medul·la espinal cervical de pacients amb FRDA demostra un aprimament consistent on és evident la degeneració de les columnes posteriors i laterals (51). La pèrdua de fibres mielinitzades i la presència gliosi són característiques comunes de la neurodegeneració d'aquestes regions de la medul·la espinal (44).

En estadis més avançats de la malaltia, apareix normalment afectació en el cerebel com a conseqüència secundària de la neuropatologia sensitiva. El nucli dentat presenta una afectació severa caracteritzada per una pèrdua de les neurones grans glutamatèrgiques, i conseqüentment de les cèl·lules de Betz a l'escorça cerebral motora. La pèrdua severa de neurones glutamatèrgiques, com a terminals que contenen àcid γ -aminobutíric (GABA), comporta la deterioració de les connexions corticonuclears (34). El còrtex cerebel·lós es manté sense afectació en les etapes inicials de la malaltia, però en estadis més avançats generalment mostra una pèrdua de les cèl·lules de Purkinje (4,42,43,52). Quan l'atròfia del tracte piramidal està avançada, s'observa la pèrdua de cèl·lules piramidals o cèl·lules de Betz, a les zones motores primàries de l'escorça cerebral. En alguns casos els pacients amb FRDA també presenten pèrdua neuronal en els nervis òptics, nucli subtalàmic, tàlem i globus pàl·lid (42,43). En general, l'atròfia progressiva de les vies sensorials i cerebel·loses causa atàxia, disàrtria, inestabilitat de la marxa i pèrdua sensorial profunda.

En l'atàxia de Friedreich alguns pacients desenvolupen cardiomiopatia hipertròfica, que es caracteritza per un engronsament de les parets del septe ventricular i del ventricle esquerra, i de vegades també per un augment del volum del ventricle esquerra, provocant arrítmies i crisis cardíques, les quals són la causa més freqüent de mort en els pacients. La cardiomiopatia es genera per la fibrosis intersticial, la hipertrofia i degeneració de les cèl·lules cardíques, la necrosi muscular i l'acumulació intracel·lular de lipofuscina, ferro i dipòsits de calci (4,8,10,27,53). Aproximadament el 80% dels pacients amb atàxia de Friedreich mostren una geometria del

ventricle esquerra alterada en ecocardiografies, i anormalitats en les ones T invertides en electromiografies (54–56). En estadis inicials de la malaltia, la cardiomiopatia es caracteritza per una hipertròfia concèntrica del cor, en la qual s'incrementa el gruix de la paret del ventricle esquerra i del septe ventricular degut a la hipertròfia dels cardiomiòcits. A mesura que la patologia progressa, en estadis més avançats, el ventricle esquerra del cor s'estira, i les parets ventriculars s'aprimen degut a la fibrosi i la pèrdua de cardiomiòcits, de manera que s'incrementa el volum ventricular causant una cardiomiopatia dilatada o excèntrica que provoca taquicàrdia supraventricular degut a la incapacitat per bombejar correctament la sang. Taquicàrdies prolongades causen palpitations i arrítmies, i en conseqüència parades cardíques i en alguns casos la mort dels pacients amb FRDA (35,57–60). A nivell cel·lular, s'ha detectat proliferació mitocondrial, pèrdua de sarcòmers contràctils i l'acumulació de ferro, tot i que en un petit percentatge de cardiomiòcits (34,57,61). També s'ha detectat l'acumulació de ferritina, calci i lipofuscina, que és un agregat de lipoproteïnes format de la degradació de proteïnes que contenen ferro en el lisosoma, i per tant la seva acumulació indica una deficiència en el procés d'autofàgia (62). Tanmateix s'ha demostrat defectes en la funció mitocondrial i concretament de la cadena transportadora de electrons (63,64).

Sistema	Patologia	Resultat clínic
Neurològic	Degeneració de les neurones grans sensibles (Propiocepció)	Pèrdua dels reflexes tendinosos
	Degeneració dels tractes espinocerebel·losos (Dorsal)	Pèrdua de la coordinació i l'equilibri
	Degeneració del nucli dentat del cerebel	
		Disàrtria
	Degeneració dels tractes corticospinals	Moviments oculars anormals (moderats)
Cardíac	Cardiomiopatia hipertròfica (primer hipertròfia i posteriorment fibrosi)	Electrocardiograma anormal Arrítmies Fallada cardíaca progressiva
Endocrí	Pèrdua de les illes pancreàtiques	Diabetis mellitus
	Increment de la resistència a insulina	
Ortopèdic	Escoliosi Peu bot	

Taula 2. Característiques clíniques principals de l'atàxia de Friedreich (65).

La diabetis mellitus és un desordre metabòlic que es produeix per la presència d'altres concentracions de glucosa en sang degudes a la impossibilitat d'absorció per culpa de defectes en la producció d'insulina per part de les cèl·lules β -pancreàtiques o per una resistència a l'acció de la insulina per utilitzar la glucosa. En l'atàxia de Friedreich, la diabetis s'ha descrit com una alteració patològica en alguns pacients, amb una incidència variable entre el 8 i 32% del total dels casos, amb aparició al voltant dels 15 anys després de l'inici de la malaltia (15,27,36,66–68). A més, aproximadament el 49% dels pacients presenten alteracions en la tolerància a glucosa (32).

La causa de la diabetis en la FRDA és la disfunció i mort de les cèl·lules β -pancreàtiques, que en conseqüència provoca un dèficit d'insulina. També s'ha descrit que els pacients poden desenvolupar resistència a insulina, a banda de la pèrdua a la tolerància a la glucosa (32,33,69,70).

6. Diagnòstic i monitorització.

El diagnòstic de l'atàxia de Friedreich, caracterització i monitorització de la progressió la patologia es realitza a través d'un examen genètic, clínic i un detallat examen físic. El diagnòstic es confirma a nivell genètic, determinant la presència de l'expansió en homozigosi del triplet GAA en l'intró 1 del gen *FXN* del cromosoma 9 mitjançant *triplet repeat primed* PCR (TP-PCR), i es quantifiquen el número de repeticions del triplet de nucleòtids GAA. Donat que en aproximadament un 2% dels casos, la FRDA pot ser deguda a l'expansió del triplet GAA en un al·lel i a mutacions puntuals en el gen de frataxina en l'altre al·lel, es seqüencien també els exons codificants del gen *FXN*. No s'han identificat fins ara d'altres mutacions patològiques.

A nivell clínic, les proves que s'inclouen per caracteritzar la malaltia són exploracions d'imatges de ressonància magnètica o tomografia computeritzada, que mostren aparença normal en els estadis inicials de la malaltia, però que progressivament mostren atròfia variable de la medulla espinal cervical i en un estadi més avançat del cerebel (71–73). Els estudis d'electrofisiologia en els nervis sensitius perifèrics, que revelen l'absència o reducció dels potencials d'acció sensitius, i l'absència del reflex H (74). L'electromiograma (EMG) per avaluar l'activitat elèctrica de les cèl·lules musculars. L'electrocardiograma i ecocardiograma per determinar l'existència de la cardiomiopatia característica en alguns casos de la malaltia. L'avaluació dels nivells de glucosa a partir de mostres de sang o orina que es realitzen per determinar els casos amb intolerància a la glucosa o la diabetis mellitus.

L'avaluació a nivell físic i monitorització dels signes patològics de la malaltia en els pacients es realitzen mesurant una sèrie de paràmetres estandarditzats per obtenir un valor quantitatiu i poder analitzar l'evolució de la progressió de la malaltia i establir un grau de severitat en el temps mitjançant una escala de qualificació. A més, per tal d'avaluar una teràpia en que aturi la progressió de la malaltia, és imprescindible establir una escala de qualificació on les mesures utilitzades per detectar canvis clínicament significatius siguin precises (75). Mesurar l'estat i la progressió patològica de la FRDA és un repte degut a la variabilitat clínic i l'heterogeneïtat de la malaltia pel fet de ser un trastorn multisistèmic, de progressió lenta, amb diferents rangs d'edat d'aparició i d'evolució de la severitat de la patologia a causa del número variable de repeticions del triplet GAA. Existeixen tres escales de classificació acceptades actualment per la comunitat de neurologia clínic per monitoritzar la progressió de la malaltia i avaluar l'efecte de tractaments en assajos clínics. Aquestes són l'Escala Internacional de Classificació Cooperativa de l'Atàxia

(ICARS), l'Escales de Classificació d'Atàxia de Friedreich (FARS) i l'Escales per a l'Avaluació i Classificació de l'Atàxia (SARA) (75–77). Les tres mesuren aspectes motors de la disfunció cerebel·losa, inclosa l'atàxia de la postura, de la marxa i de les extremitats.

L'escala ICARS es compon de quatre subescales que mesuren la postura i la marxa, la funció cinètica de les extremitats, la disàrtria i la funció oculomotora; el sumatori de les quals té un valor màxim d'afectació de 100 (78,79). Aquesta escala s'ha utilitzat àmpliament per avaluar tractaments en assajos clínics, però donat que molts d'ells no van mostrar eficàcia, s'ha qüestionat el seu ús com a escala primària en l'avaluació d'assajos clínics (80).

L'escala FARS és una escala de qualificació clínica específica de la FRDA. El valor patològic màxim és 159, provinent del sumatori de tres subescales que avaluen l'atàxia, les activitats de la vida diària i un examen neurològic en que es mesuren les funcions del bulb, les extremitats superiors i inferiors, els nervis perifèrics, i l'estabilitat vertical i la marxa (81,82). És la única de les escales que té en consideració característiques que no estan directament relacionades amb l'examinació física com l'activitat de vida diària.

L'escala SARA, la més simple de les tres, inicialment es va utilitzar per a l'avaluació d'atàxies espinocerebel·loses (SCA) d'aparició a l'edat adulta, però posteriorment s'ha utilitzat per la qualificació de la FRDA. Està basada principalment en l'avaluació semiquantitativa de l'atàxia cerebel·losa, mitjançant la mesura de vuit paràmetres que avaluen la marxa, la postura, el seure, la parla i la funció cinètica de les extremitats (83–85). Tot i que el cerebel està directament involucrat en la coordinació dels moviments dels ulls, la funció oculomotora no està considerada en aquesta escala, que si contempen les altres dos escales. A més donat que exclou l'avaluació de mesures extracerebel·loses, i que la malaltia es caracteritza per l'atàxia i neuropatia sensorials i els dèficits de propiocepció, s'ha discutit la seva aplicabilitat per la FRDA. Malgrat això, l'ús d'aquesta escala està en augment per la facilitat de mesura dels paràmetres i l'alta sensibilitat per detectar canvis patològics en el temps en comparació amb les escales ICARS i FARS.

7. Causa genètica.

L'atàxia de Friedreich és una malaltia d'herència autosòmica recessiva. Un individu amb atàxia de Friedreich hereta cadascun dels cromosomes amb la mutació en el gen *FXN* dels pares, que són portadors asimptomàtics, amb un únic al·lel afecte. La probabilitat teòrica de que dos pares portadors tinguin un fill amb la malaltia és d'un 25%, el 50% dels fills serien portadors asimptomàtics de la mutació igual que els pares, i un 25% no portador.

El 1996, es va identificar la causa genètica de l'atàxia de Friedreich com un defecte en el gen *X25*, tal com es va anomenar inicialment el gen *FXN*, ubicat al cromosoma 9 (banda 9q21) (15). La

mutació genètica majoritària causant de la malaltia consisteix en l'expansió anormal en homozigosi del triplet de nucleòtids GAA localitzat a l'interior d'una seqüència Alu en el primer intró del gen *FXN*. Més del 96% dels pacients amb atàxia de Friedreich presenten en ambdós al·lells del gen *FXN*, un número de repeticions GAA d'entre 66 - 1.700, més freqüentment entre 600 i 900, en cada cromosoma 9. La majoria dels individus sans no portadors contenen fins aproximadament 35 repeticions del triplet GAA, i els individus portadors heterozigots per l'expansió anormal de les repeticions GAA esdevenen asimptomàtics (28). Entre el 2-4% restant dels pacients amb FRDA, presenten en heterozigosi composta l'expansió patològica del triplet de nucleòtids GAA en un al·lel del gen *FXN* i una variant patogènica en l'altre al·lel, consistent en mutacions puntuals, delecions, insercions que afecten la síntesi i funció correcta de la proteïna frataxina, fent que es desenvolupi l'atàxia de Friedreich, sovint en formes atípiques de la malaltia, caracteritzades per un inici, progressió, simptomatologia i severitat diferents a la patologia típica (86–88). Fins la data s'han descrit més de 17 mutacions diferents en el gen *FXN* capaces de desencadenar la malaltia (89–91) (**Taula 3**).

CODI OMIM	VARIANT AL·LÈLICA QUE PROVOCA ATAXIA DE FRIEDREICH
606829.0001	Expansió GAA en l'intró 1.
606829.0002	Transversió en l'exó 3 Leu106X.
606829.0003	Transició de A a G c.385-2A>G que interromp el lloc acceptor de l'empalmament que es produeix en l'extrem del tercer intró.
606829.0004	Canvi de Ile154Phe en l'exó 4.
606829.0005	Canvi de Gly130Val.
606829.0006	Canvi en el codó d'inici de la frataxina Met1Ile.
606829.0007	Canvi Trp173Gly.
606829.0008	Deleció d'1 nt en el codó 75 que provoca el truncament de la proteïna.
606829.0009	Deleció de 6 nt i inserció de 15 nt (c.371_376del6ins15) en l'exó 3.

Taula 3. Variants al·lèliques identificades més freqüents en el gen *FXN* en l'atàxia de Friedreich.
Nomenclatura d'acord amb la base de dades *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (37).

El número de repeticions GAA pot incrementar o disminuir entre les generacions d'individus degut a la inestabilitat que presenten sobretot durant la meiosi. D'aquesta manera, els individus sans que contenen entre 30 i 66 repeticions GAA no patològiques es troben en un interval premutacional on potencialment poden incrementar i transmetre l'expansió patològica de les repeticions a la descendència (92,93).

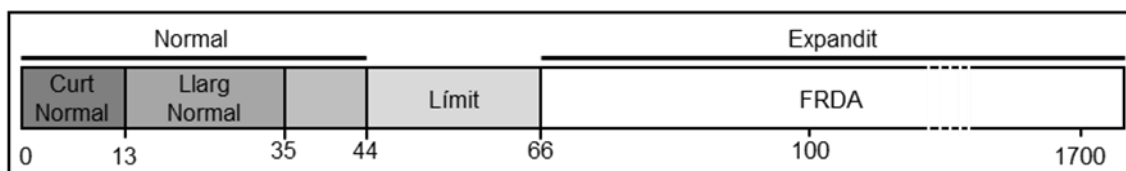


Figura 1. Número de repeticions del triplet GAA en al·lels normals, en el límit i expandits. La conseqüència fenotípica dels al·lels entre 35-44 repeticions GAA es desconeix. Els al·lels que es troben en el límit poden causar la malaltia en un fenotip lleu. Figura adaptada de (37).

Les expansions GAA llargues en general causen un fenotip més sever amb una edat d'aparició més precoç, una progressió més ràpida i l'augment d'aparició dels signes no neurològics. Però, concretament, ho determina la longitud de l'al·lel més curt, que correlaciona inversament amb l'edat d'aparició dels símptomes i proporcionalment amb la severitat i progressió de la malaltia. (27,31,66,94-96). Tanmateix, la variabilitat en edat d'inici de la malaltia, no depèn exclusivament del nombre de repeticions GAA, sinó també d'altres factors com la presència d'interrupcions estabilitzants en l'expansió (92), del mosaïcisme somàtic i de la inestabilitat de l'expansió durant la vida. I és que s'ha demostrat que el nombre de repeticions analitzades en cèl·lules de sang perifèrica no reflecteixen necessàriament la distribució de la longitud de les repeticions en altres teixits a causa del mosaïcisme somàtic. Per exemple en el sistema nerviós central es va identificar evidència d'inestabilitat mitòtica de l'expansió (97), i també en el cor i el pàncrees on aquesta inestabilitat somàtica és més gran que al sistema nerviós central (98). La inestabilitat postzigòtica augmenta a mesura que les persones amb FRDA envelleixen (98,99).

L'expansió trinucleòtida GAA del gen *FXN* provoca un silenciament parcial de la transcripció del gen causant nivells anormalment baixos d'ARNm de frataxina, i en conseqüència una deficiència en la síntesi de la proteïna frataxina (100). Els nivells d'ARNm de *FXN* en pacients amb atàxia de Friedreich es redueixen a un nivells aproximadament entre 5-30% respecte els individus sans no portadors (100,101). S'ha demostrat que el nombre de repeticions correlaciona proporcionalment amb una repressió transcripcional més severa (102).

El silenciament transcripcional parcial resulta en una deficiència de la iniciació i elongació transcripcional del gen *FXN*, on el promotor es troba silenciament i l'ARN polimerasa II (pol II) queda bloquejada a la regió 5' de les repeticions GAA impedit l'elongació de la transcripció (103). Durant els anys s'ha investigat la causa molecular per explicar com l'expansió trinucleòtida GAA afecta el silenciament gènic.

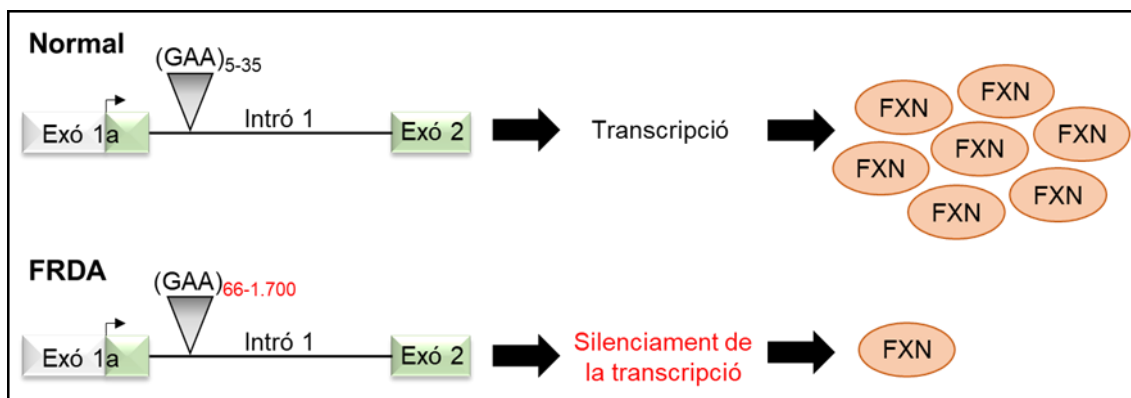


Figura 2. Esquema de l'efecte de l'expansió del triplet de repeticions GAA a l'intró 1 del gen en la transcripció i expressió de frataxina en l'ataxia de Friedreich. En els exons, la regió codificant correspon al color verd, i la regió no codificant en blanc. El número de repeticions en vermell indica que són patològiques, causant el silenciament de la transcripció.

En primer lloc es va proposar que l'expansió trinucleòtida GAA provoca la formació d'estructures no canòniques com estructures de cadena triple d'ADN o híbrids de cadenes ADN-ARN, coneguda com estructura *R-loop* (o bucle R), que es forma per la interacció de la cadena d'ARNm sintetitzada per la ARN polimerasa amb la cadena motlle d'ADN o per la interacció amb FAST-1, un transcrit antisentit que s'ha detectat en la mateixa regió de l'expansió de GAA en direcció al promotor i que podria inhibir la transcripció (101,104–108).

Es va suggerir que el dèficit d'ARNm madur de *FXN* pot ser causat per un empalmament aberrant que provoca la retenció de l'intró 1, degut a l'incapacitat de reclutament de factors de empalmament en la zona de les repeticions GAA (109). D'altra banda, no hi ha prou evidència de que l'expansió GAA provoqui l'acumulació d'ARNm aberrant tòxic o l'acumulació de preARNm amb les repeticions patològiques GAA tal com passa per exemple en la distròfia miotònica tipus 1 (DM1) i la distròfia corneal endotelial de Fuchs (110,111).

Més recentment es va proposar que l'expansió GAA incrementa la metilació epigenètica dels llocs CpG localitzats dins la seqüència Alu de l'intró 1 del gen *FXN* flanquejant les repeticions GAA a través de la reducció en l'acetilació de les histones, produint la formació d'heterocromatina, consistent en estructures de cromatina compactades, on les histones mantenen les cadenes d'ADN unides i empaquetades, impossibilitant l'elongació de l'ARNm, la unió de factors de transcripció i en conseqüència bloquejant la transcripció de l'ARN polimerasa (112–117). S'ha demostrat que pacients amb atàxia de Friedreich tenen hipocetilació de les histones H3 i H4, trimetilació de la histona H3K9, metilació de la histona H3K27 i uns nivells de metilació de l'ADN en l'intró 1 prop de les repeticions molt més elevats que els individus no portadors (118). A més, inhibidors de la deacetilació d'histones (HDACi), mantenen les histones acetilades, inhibint aquesta metilació i en conseqüència, incrementant l'expressió tant d'ARNm com de proteïna *FXN* (115).

La conseqüència final de l'expansió del trinucleòtid GAA en l'intró 1 del gen *FXN* en homozigosi és per tant el silenciament parcial de la transcripció, que produeix una deficiència dels nivells de proteïna frataxina causants de tots els signes patològics característics de l'atàxia de Friedreich.

8. Estructura i regulació del gen *FXN*.

El gen humà *FXN* comprèn aproximadament 80 kb i es localitza en el cromosoma 9 (9q21.11) (109). S'han descrit 7 exons, 6 d'ells totalment o parcialment codificants, capaços de generar 4 transcrits que poden codificar, cadascun d'ells, diferents proteïnes frataxina, degut a empalmaments o inici de transcripció alternatius. L'intró 1 del gen, de 10.437 pb, conté les repeticions del triplet GAA en l'interior d'una seqüència Alu, prop de l'exó 1a, concretament a 1.334 pb (119).

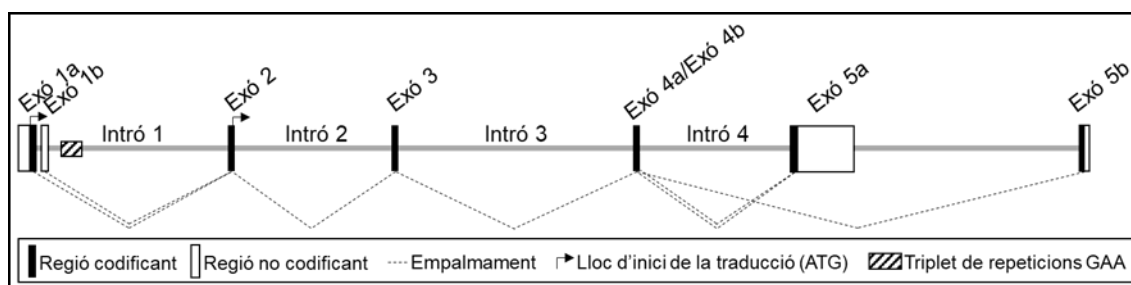


Figura 3. Estructura del gen frataxina humà (*FXN*). Les caixes indiquen els exons, on en negre fa referència a la regió codificant de cada exó, i en blanc la regió no codificant. Les expansions del triplet de repeticions GAA es mostren en l'intró 1 en un requadre amb ratlles negres en diagonal. Les línies discontinues indiquen els empalmaments entre exons per formar els diferents transcrits.

A dia d'avui, es coneix poc sobre la regulació del gen *FXN*. S'ha descrit que 1.255 pb de la regió 5' immediatament abans de l'inici de la seqüència codificant en l'exó 1a forma part del promotor del gen (120). No conté seqüència TATA característica de la iniciació transcripcional en molts gens eucariotes. En el seu lloc, conté una seqüència iniciadora (Inr) juntament amb un element promotor a 26 pb de distància del lloc d'inici transcripcional (120). La regió promotora de 1.255 pb és rica en elements repetitius d'origens diferents com retroelements (*AluJb*, *AluY* i *L2*) i repeticions intercalades entre mamífers (MIR) que han demostrat incrementar l'activitat promotora (120). Més recentment, s'ha identificat una regió de 17 pb a 4,9 kb en la zona 5' de l'inici de la seqüència codificant, on s'uneix el factor transcripcional Oct-1, que tindria un rol important en la regulació del gen (121). S'ha demostrat que tant l'exó 1 com la zona de l'intró 1 situada entre l'exó 1a i les repeticions GAA, té capacitat per regular el gen *FXN*. Concretament, s'han identificat llocs d'unió de factors transcripcionals amb capacitat moduladora com *SRF*, *TFAP2* en l'exó1, i *EGR3* i *E-box* en l'intró1 (122). El domini *E-box* s'ha determinat que modula l'activitat del promotor, ja que la seva depleció en redueix significativament la seva activitat

(114). També s'ha proposat que el gen *FXN* està regulat per ferro, ja que s'ha vist que l'addició de quelants de ferro redueix els nivells d'ARNm i proteïna frataxina en cèl·lules de pacients amb FRDA, mentre que l'addició de ferro, n'incrementa l'expressió (123). Tot i que se'n desconeix els mecanisme de regulació, el gen *FXN* podria contenir llocs d'unió a elements sensibles al ferro (IRE) en les zones reguladores no codificants, tal com s'ha descrit que succeeix en gens involucrats amb el metabolisme del ferro com ferroxidasa (*FTH1*), ferritina (*FRT*), aconitasa (*ACO2*), entre altres (124,125).

Fins l'actualitat, en el gen humà *FXN* s'han descrit 4 transcrits d'ARNm que potencialment poden traduir a frataxina. El transcrit 1 (ENST00000484259.3, Ensembl), d'1,3 kb de longitud amb 633 pb de seqüència codificant, conté els exons 1a, 2, 3, 4a, 5a, i codifica per la isoforma 1, que és la forma canònica i més abundant de la proteïna frataxina amb 210 aa en la seva forma precursora, i 130 aa un cop madurada en l'interior de la mitocondria (15). El transcrit 2 (ENST00000396364.7, Ensembl), de 516 pb conté els exons 1a, 2, 3, 4a, 5b i pot codificar per una proteïna frataxina de 171 aa. Conté un exó 5 diferent, perquè es realitza un empalmament alternatiu de l'exó 4a a l'exó 5b, de 244 pb, situat a unes 40 kb en el gen respecte l'exó 5a, de manera que canvia la seqüència completament, generant una proteïna d'una mida més curta degut a un codó d'aturada (15). El transcrit 3 (ENST00000396366.6, Ensembl), de 591 pb, conté els exons 1a, 2, 3, 4b, 5a i codifica per una proteïna de 196 aa (126). S'ha vist expressat en cervell, cerebel, medulla espinal, cor i múscul esquelètic. En l'exó 4, degut a un empalmament alternatiu, l'ARN polimerasa allarga l'exó 8 pb abans de fer l'empalmament a l'exó 5a, considerant doncs que conté un exó 4b, que és exactament igual que el 4a però amb aquests 8 pb més. Aquest prolongament de l'exó 4 canvia el marc de lectura podent generar una proteïna que en l'extrem carboxil terminal és completament diferent a la isoforma 1 (126). Els transcrits 2 i 3 són poc comuns i la seva expressió no s'ha estudiat amb profunditat, de manera que s'ha qüestionat la significança funcional de les isoformes de frataxina resultants (37). El transcrit 4 (ENST00000377270.8, Ensembl), amb 408 pb de seqüència codificant, no conté l'exó 1a, sinó que inicia la transcripció en l'exó 1b, una regió de 45 pb de l'interior de l'intró del gen i fa empalmament amb l'exó 2, i continua amb l'exó 3, 4a, 5a. L'exó 1b no codifica per proteïna, el codó d'inici de la traducció es localitza en la meitat de l'exó 2 i manté el mateix marc de lectura que el transcrit 1, podent codificar una proteïna de 135 aa, on 130 aa són exactament iguals a la forma madura de la isoforma 1, per tant, manté el mateix extrem C-terminal funcional. Els transcrits 1, 2 i 3 tenen l'exó 1a, que és el que codifica el pèptid de trànsit a la mitocondria, per tant les proteïnes codificants resultants són capaces de translocar-se a la mitocondria, però difereixen en la part 3' de la seqüència d'ARNm. En canvi, el transcrit 4 pot generar una isoforma que no té la seqüència de localització mitocondrial, per l'absència de l'exó 1a, de manera que no localitza a la mitocondria, però manté la identitat amb la isoforma 1 (127) (**Figura 4**).

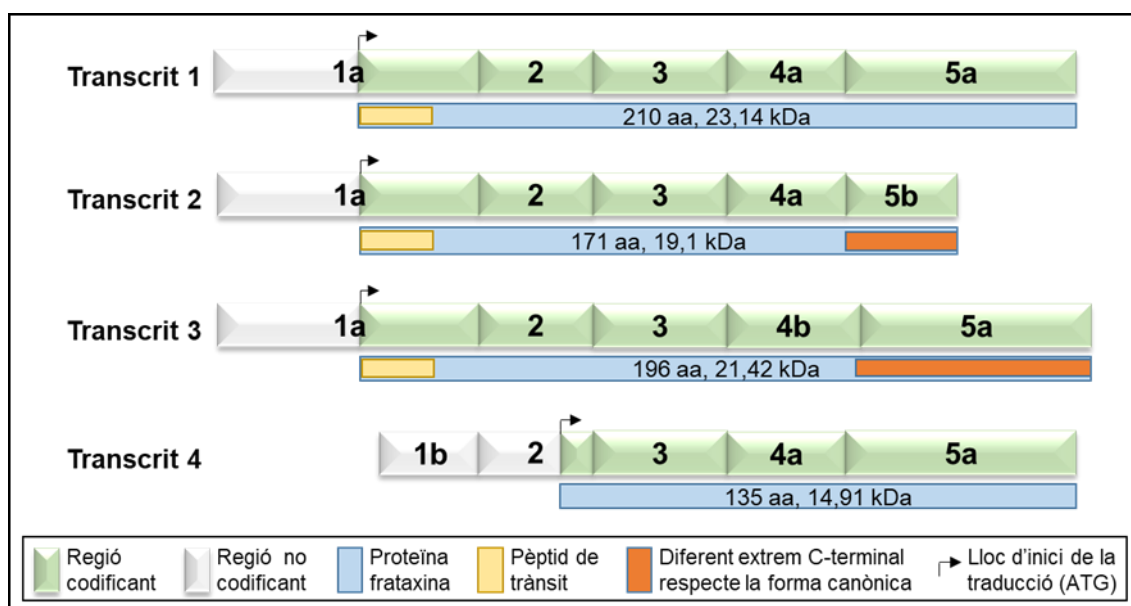


Figura 4. Esquema dels transcrits i proteïnes descrites que es poden generar a partir del gen *FXN* humà. En l'esquema hi figura el pèptid de trànsit en groc, inclòs en la proteïna frataxina que es genera dels transcrits 1, 2 i 3. El requadre vermell marca una seqüència proteica que difereix respecte la forma canònica del transcrit 1, degut a l'empalmament alternatiu en el transcrit 2, i un canvi del marc de lectura en el transcrit 3. La resta de seqüència proteica en blau és idèntica entre isoformes.

9. La proteïna frataxina.

El gen *FXN* codifica per una proteïna petita àcida soluble mitocondrial altament conservada durant l'evolució, d'expressió ubiqua i essencial per a la vida, anomenada frataxina (15,128). L'absència total d'aquesta proteïna causa la letalitat en estadi embrionari de ratolins (129), i la seva síntesi deficient, conseqüència de l'expansió en homozigosi de les repeticions trinucleòtides GAA en l'intró 1 del gen *FXN*, causa l'atàxia de Friedreich en humans. Els individus portadors, heterozigots per l'expansió GAA, tenen nivells de frataxina inferiors als individus no portadors però són asimptomàtics (130,131). Es tracta d'una proteïna principalment mitocondrial i amb expressió en pràcticament tots els teixits, però amb nivells més elevats predominantment en aquells teixits amb una elevada taxa metabòlica, inclosos el fetge, el ronyó, el sistema nerviós i el cor (132). La funció cel·lular específica que desenvolupa és actualment desconeguda però s'ha descrit que està estretament relacionada amb el metabolisme del ferro, concretament amb l'homeòstasi del ferro (133), la formació de centres Fe-S (16,134,135), la formació de grups hemo (136,137), emmagatzematge de ferro (138), la fosforilació oxidativa (18,19) i la resposta a l'estrès oxidatiu (20,139).

En l'atàxia de Friedreich, la deficiència de frataxina provoca una biosíntesi deficient dels clústers ferro-sofre que són necessaris en el transport d'electrons utilitzats pels complexos de la cadena respiratòria en la mitocondria i l'acoblament de l'aconitasa. Com a conseqüència es genera una

deficiència en la producció d'energia, la desregulació de la funció mitocondrial, s'acumula ferro en l'interior mitocondrial alterant la seva homeòstasi, generant espècies reactives d'oxigen (ROS) i estrès oxidatiu. La mitocondria col·lapsa, no pot desenvolupar la seva funció amb normalitat i la cèl·lula inicia un procés de degeneració i apoptosi, afectant principalment a les cèl·lules dels teixits amb més taxa metabòlica com les neurones dels DRG, dels cardiomiòcits i de les cèl·lules β -pancreàtiques.

9.1. Expressió i localització.

En els éssers humans l'expressió del gen *FXN* i en conseqüència de la proteïna són ubics, s'expressen en totes les cèl·lules i teixits. Tot i això, els nivells d'expressió d'ARNm i proteïna frataxina mostren especificitat per alguns teixits que es correlacionen parcialment amb els llocs principals d'afectació de la malaltia, de manera que els teixits amb nivells més alts d'expressió de frataxina són en part més vulnerables al seu dèficit. En els humans adults, s'han detectat els nivells més alts d'expressió de frataxina al cor, la medul·la espinal i els ganglis de l'arrel dorsal, amb nivells intermedis observats en el cerebel, sobretot la capa granular, el fetge, el múscul esquelètic, el pàncrees, el timus, el teixit adipós i nivells molt baixos a l'escorça cerebral (15). Els pacients FRDA tenen uns nivells deficients de proteïna frataxina, entre 5 i 35% respecte dels nivells d'individus no portadors, que acostumen a ser inferiors al 10% en teixits perifèrics (100). Interessantment, els individus sans portadors, contenen menys d'un 50% de frataxina respecte els nivells dels individus no portadors, sense mostrar signes d'afectació patològica.

Dins la cèl·lula la frataxina localitza principalment en la mitocondria, concretament a la matriu mitocondrial (100,132). L'ARNm de frataxina es tradueix en els ribosomes citoplasmàtics, i un cop sintetitzada la proteïna aquesta es transloca a la mitocondria degut a la seqüència de localització mitocondrial que conté en l'extrem N-terminal. Per entrar en la mitocondria, la frataxina es tallada en dos passos proteolítics realitzats per la peptidasa de processament mitocondrial (MPP) generant la proteïna frataxina madura (140–142). Tot i això, s'ha descrit formes extra-mitochondrials que tindrien una funció relacionada amb la supervivència cel·lular i que interaccionaria amb l'aconitasa citosòlica (IRP1) (143,144), així com isoformes que localitzen en el citosol en cèl·lules eritròcits i teixits del sistema nerviós, i inclús en el nucli en teixit cardíac (127,145).

9.2. Estructura.

La seqüència d'aminoàcids de la frataxina es pot dividir en dues parts, la part N-terminal absent en els organismes procariotes i poc conservada en els eucariotes, i la part C-terminal, altament conservada en l'evolució, que és la que es manté en humans i entra en la mitocondria després del procés de escissió i maduració. Per aquest motiu s'atribueix que la regió C-terminal conté els dominis funcionals de la proteïna (146–148).

L'estructura secundària de la proteïna frataxina madura humana, corresponent a la part C-terminal, consta de set fulles beta antiparal·leles que fan de suport a dos hèlixs alfa, formant un sandvitx $\alpha\beta$ compacte i globular (146,149). Entre l'hèlix $\alpha 1$ i la fulla β -1 hi ha un grup de 12 aminoàcids (Glu-92, Glu-96, Glu-100, Glu-101, Glu-104, Glu-108, Glu-111, Asp-112, Asp-115, Glu-121, Asp-122, y Asp-124) exposats cap a l'exterior de la proteïna, que per la seva proximitat i orientació creen una zona aniònica i àcida molt conservada a tots els eucariotes, inclosos animals, plantes, llevats i procariotes, que és perfecta per la unió d'ions carregats positivament (cations), com el Fe^{2+} (149–155). L'autodegradació i el procés de proteòlisi de la part N-terminal han impedit fins la data fer una caracterització de la proteïna íntegra amb la seqüència inicial precursora. Els residus conservats que es localitzen en el nucli hidrofòbic aporten estabilitat al plegament de la proteïna, mentre que els residus exposats a la superfície de la proteïna estan associats a la funció proteica (149). L'estructura terciària de la frataxina humana (92-210 aa) es caracteritza per ser globular, de forma esfèrica amb un nucli hidrofòbic compacte (146,156).

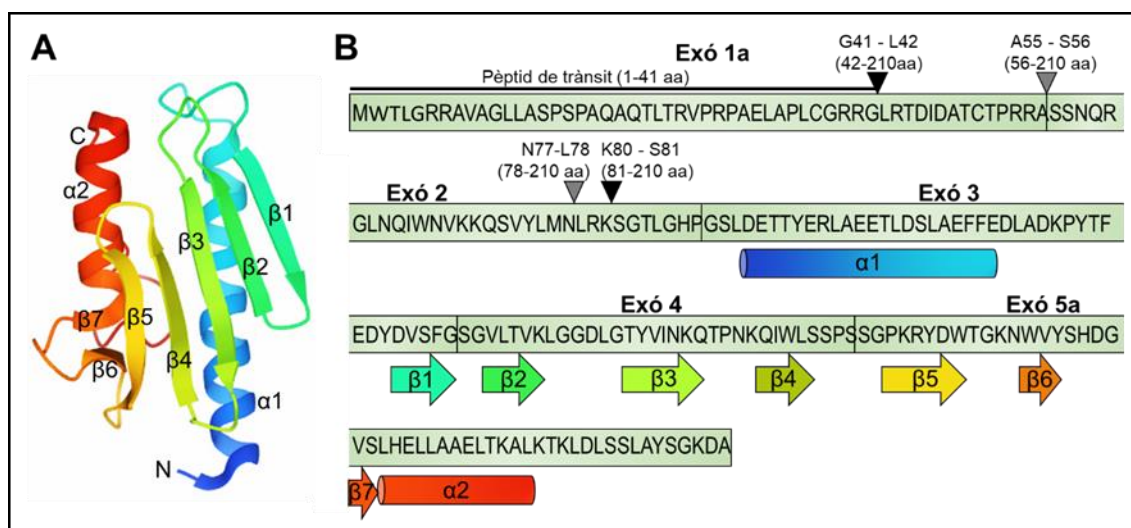


Figura 5. Estructura i seqüència aminoacídica de la isoforma canònica de la frataxina humana. A) Representació de la frataxina humana plegada. L'estructura forma un sandvitx $\alpha\beta$, compost per 2 hèlixs alfa i 7 fulles beta antiparal·leles. N, indica l'extrem amino; C, l'extrem carboxil. **B)** Seqüència aminoacídica de la isoforma 1 humana de frataxina. Els elements d'estructura secundària estan marcats amb els mateixos

colors que en la figura A. Les fletxes indiquen el lloc de tall de la peptidasa de processament mitocondrial (MPP), on en negre es mostra el tall habitual, i en gris els talls alternatius descrits. Figura adaptada de (149).

9.3. Maduració i isoformes.

La proteïna frataxina (Q16595-1, Uniprot) conté diverses isoformes provinents de diferents transcrits d'ARNm diferents, la més comú es sintetitza a partir del transcrit 1 i és la isoforma més abundant en general a tots els teixits, i se li atribueixen totes les funcions mitocondrials, és per això que se l'anomena la forma canònica (15). Aquesta isoforma es sintetitza en el citosol i inicialment conté 210 aminoàcids (aa) en la seva forma precursora, amb un pes molecular de 23,135 kDa. Aquesta forma proteica precursora conté una seqüència N-terminal de 41 aa corresponent a un pèptid de trànsit que la dirigeix a la matriu mitocondrial, on es processada en una fase de maduració per la MPP, que la talla en diferents formes més petites (157,158). La forma precursora de frataxina sofreix un primer tall de maduració entre G41-L42, formant una forma intermediària (FXN42-210) de 169 aa (42-210 aa) (18,826 kDa), de manera que perd la seqüència de localització mitocondrial i queda internalitzada en la mitocòndria (158). Posteriorment, la MPP en condicions normals realitza un segon tall en la seqüència aminoacídica de la forma intermediària a K80-S81, quedant la forma madura (FXN81-210), de 130 aa (14,268 kDa), que és la forma més comú en que es troba la proteïna frataxina en l'interior mitocondrial i la que li permet realitzar la seva funció (158,159).

Quan el procés de maduració normal falla, es poden generar formes alternatives de frataxina. Concretament, s'ha vist en cultius *in vitro* de cèl·lules, que quan el lloc de tall K80-S81 està bloquejat i la MPP no pot finalitzar el procés de maduració, alternativament realitza el segon tall a A55-S56 formant la forma FXN56-210 de 155 aa (17,26 kDa) (141,158). També en cultiu cel·lular *in vitro*, per espectrometria de masses s'ha trobat una forma madura (FXN78-210) de 133 aa i 14,666 kDa, formada a partir d'un segon tall de la MPP en N77-L78, que no s'ha pogut validar *in vivo* (160).

Com s'ha explicat anteriorment, es poden sintetitzar diferents isoformes de frataxina a partir dels altres 3 transcrits descrits que es generen per empalmament o inicis de transcripció alternatius. La isoforma 2 (Q16595-2, Uniprot) de 171 aa i 19,1 kDa (15,126), generada a partir d'un transcrit que conté un exó 5 alternatiu (exó 5b), conté un codó d'aturada prematur i es diferencia en 11 aminoàcids en l'extrem C-terminal respecte la isoforma 1. La isoforma 3 (Q16595-3, Uniprot) de 196 aa i 21,42 kDa, és sintetitzada a partir d'un transcrit generat per empalmament alternatiu de l'exó 4 (exó 4b), que canvia el marc de lectura de l'exó 5a, introduint un codó d'aturada prematur, produint una proteïna amb un extrem C-terminal més curta, diferent a la isoforma 1 (15,126). Aquestes dos isoformes comparteixen l'extrem N-terminal igual que la isoforma 1, i per tant podrien translocar-se a la mitocòndria, però difereixen en l'extrem funcional C-terminal, de

manera que podrien desenvolupar altres funcions, tot i que no s'han caracteritzat. La isoforma 4 (C9JAX1, Uniprot), s'ha trobat enriquida sobretot en teixits del sistema nerviós com el cerebel, la medul·la espinal, els ganglis de l'arrel dorsal així com en els eritròcits de la sang (127,145). Es sintetitza a partir d'un transcrit que s'inicia en un exó 1 alternatiu (exó 1b) que no és codificant, de manera que el codó d'inici es troba en l'exó 2. La proteïna generada, de 14,91 kDa, conté 135 aa, que són idèntics a la regió funcional C-terminal de la isoforma 1. El fet de no tenir l'exó 1a, fa que no contingui la seqüència de localització mitocondrial. L'expressió recombinant d'aquesta isoforma en cultius *in vitro* ha confirmat que localitza en el citosol (127). Finalment hi ha una isoforma que sembla que és més específica del cor que es forma per processament alternatiu de l'ARNm de frataxina i s'ha vist que localitza en el nucli en cèl·lules transfectades amb un constructe sintètic que codifica aquesta isoforma (127). La funció d'aquestes isoformes alternatives a la forma canònica i la seva implicació en la patogènesi de l'atàxia de Friedreich es desconeix actualment (126,161,162), tot i que s'ha proposat per exemple que la isoforma 2 pot afavorir la supervivència cel·lular (143) (**Figura 4**).

9.4. Funció.

Des de que es va descriure el gen responsable de la malaltia i sobretot gràcies a la generació d'organismes models per al seu estudi, s'ha demostrat que la proteïna frataxina està relacionada amb el metabolisme del ferro. En l'atàxia de Friedreich, la seva deficiència causa una alteració de l'homeòstasi del ferro i l'increment de l'estrès oxidatiu (129). Malgrat això, actualment la funció exacta de la frataxina es desconeix, però s'han postulat diferents possibles funcions, algunes compatibles i conseqüents entre elles, i inclús algunes poden ser específiques de teixit. S'ha proposat que pot actuar com a xaperona del ferro modulant l'activitat aconitasa, com a donadora de ferro (Fe^{2+}) en la biosíntesi de centres Fe-S i grup hemo, o interaccionant amb el complex proteic que s'encarrega de la síntesi d'aquests centres Fe-S. Se l'ha relacionat amb l'activació de la síntesi energètica d'ATP, actuant com a donadora d'electrons als complexos de la cadena respiratòria mitocondrial, a través dels centres Fe-S. Se l'ha involucrat en l'emmagatzematge del ferro en condicions de saturació en la mitocòndria i per tant relacionada amb mecanismes de detoxificació del ferro, per evitar la formació d'espècies reactives d'oxigen. Per tant, es creu que té un paper en l'estrès oxidatiu i la regulació d'enzims antioxidants. Inclús alguna de les isoformes se l'ha relacionat amb la supervivència cel·lular.

9.4.1. Homeòstasi del ferro.

L'homeòstasi del ferro és fonamental per la supervivència cel·lular ja que l'ió ferro participa en processos cel·lulars essencials com la producció d'energia, la respiració, el transport d'electrons i oxigen, el metabolisme energètic mitocondrial i la síntesi d'ADN (163). La depleció de ferro

provoca mort cel·lular, i la seva acumulació causa citotoxicitat degut a la generació de ROS (164). Des d'abans d'identificar el gen causant de la FRDA, ja es van trobar dipòsits de ferro en teixits cardíacs de pacients (53). Posteriorment, a la identificació de la deficiència de frataxina com a causant de la malaltia, en models de llevat *knock-out* de frataxina es va trobar un increment de la concentració de ferro en la mitocondria, acompanyat de dany oxidatiu (133). En models FRDA també es va observar una disminució dels nivells i l'activitat de proteïnes amb centres Fe-S com l'aconitasa o els complexos de la cadena respiratòria d'electrons (16). Aquests resultats van suggerir que la deficiència de frataxina causa l'alteració de l'homeòstasi del ferro a través de l'acumulació de ferro mitocondrial, la producció d'espècies reactives d'oxigen, la inactivació de la síntesi dels centres Fe-S i la sensibilitat a l'estrès oxidatiu (165).

Una de les funcions proposades per la frataxina és la d'actuar com a proteïna d'emmagatzematge de ferro. El ferro entra a la mitocondria a través de la proteïna de transport específica mitoferrina, i un cop dins, el ferro lliure (Fe^{2+}) és emmagatzemat o segrestat per la ferritina mitocondrial a ferro oxidat (Fe^{3+}) per facilitar la mobilitat i el transport, i evitar que es produeixin reaccions redox en que es generen ROS (166). En llevat i bacteris, s'ha descrit que la frataxina homòloga d'aquests organismes té una alta capacitat per unir-se al ferro i formar estructures oligomèriques de manera similar a com ho fa la ferritina humana, actuant com una xaperona del ferro en la mitocondria i amb activitat ferroxidasa per mantenir el ferro en un estat redox inactiu (138,150,151). La frataxina humana recombinant expressada en llevats i bacteris pot formar aquestes estructures oligomèriques de ferro, tot i que té una capacitat inferior d'unió a ferro comparada amb la frataxina de llevat, fins i tot en condicions d'excés de ferro mitocondrial (153). La sobreexpressió de ferritina humana en llevats deficientes en frataxina rescata diversos fenotips suggerint que la unió a ferro i l'habilitat de destoxicar pot ser una funció exclusiva de la frataxina de llevats i procariotes (167), donat que a diferència dels organismes superiors, no expressen ferritina (166). Llevats deficientes de frataxina, que no són capaços d'oligomeritzar el ferro, no mostren afectació en la síntesi de centres Fe-S, ni grups hemo, suggerint que l'oligomerització del ferro no és essencial per realitzar aquests processos (168). Tot i aquestes evidències en bacteri i llevat, no s'ha demostrat si la frataxina en humans pot unir-se directament al ferro, ni formar agregats en condicions similars, donat que la frataxina humana no té una estructura similar a les proteïnes d'unió a ferro. Aquesta estructura de la frataxina humana en C-terminal és compacta, no té la conformació típica d'unió a ferro o grups prostètics (146). També s'ha vist que el domini de la proteïna localitzat entre les cadenes $\alpha 1$ i $\beta 1$, que potencialment es podria unir a ferro, conté residus glutamat i aspartat exposats, enlloc de residus histidina o cisteïna, que són els que normalment estan implicats en la unió de ferro (169). Finalment, l'afinitat de la frataxina humana per unir-se a ferro s'ha vist que és dèbil i no és específica, ja que permet la unió d'altres metalls divalents (146,152). Tot i aquestes evidències, la funció d'unió, oligomerització i emmagatzemament de

ferro per part de la frataxina només s'ha demostrat en estudis *in vitro*, la presència de la ferritina mitocondrial (FTMT) en el teixit humà, i diversos estudis qüestionen que la frataxina humana tingui aquesta funció *in vivo* (151,165,170).

Altres estudis han proposat que la frataxina té un rol en la síntesi de centres Fe-S i grups hemo, donat que la seva deficiència ha causat la reducció dels nivells i l'activitat de proteïnes Fe-S com les proteïnes dels complexos I, II, III de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria i l'aconitasa en biòpsies de miocardi de pacients FRDA i models FRDA, ja que requereixen de centres Fe-S i grups hemo per desenvolupar correctament la seva funció (16,135,171). La biogènesi d'aquestes proteïnes amb centres Fe-S és essencial per al desenvolupament de funcions com la traducció de proteïnes, el manteniment d'ADN, la producció d'energia o la regulació de l'expressió gènica. Aquests centres estan compostos de ferro i sofre inorgànics i es troben principalment en forma de quatre àtoms de ferro i quatre àtoms de sofre (172). En la formació de les proteïnes Fe-S mitocondrials, la cisteïna desulfurasa (NFS1), que aporta el sofre inorgànic, forma un complex proteic amb ISD11, que actua d'estabilitzador de NFS1; i la proteïna bastida ISCU que conté cisteïnes, lligands de sofre que permeten la unió directa del ferro, formant els centres Fe-S. A continuació, el centre Fe-S es transfereix i s'insereix a la proteïna Fe-S receptora a través d'un sistema de xaperones (173,174).

Inicialment es va suggerir que la frataxina podria actuar com a donadora de ferro en la formació de centres Fe-S, degut en part a la seva capacitat per unir-se a ions Fe^{2+} i perquè es va demostrar en models de llevat i cèl·lules humanes que interaccionava amb les proteïnes que formen els centres Fe-S, NFS1, ISD11 i ISCU (175–178). A més, es va demostrar la interacció física entre la frataxina humana i la ISCU1, i que aquesta era dependent de ferro (155,179). Degut a això, es va suposar que aquesta proteïna podia actuar com a donadora de ferro en l'assemblatge dels clústers Fe-S (155). Posteriorment, també es va proposar la proteïna frataxina com a regulador al·lostèric per induir i estabilitzar l'activitat del complex que formen NFS1, ISD11 i ISCU per la formació dels centres Fe-S (180–182). En models eucariotes s'havia vist que la frataxina activava la síntesi de centres Fe-S afavorint l'activitat desulfurasa de NFS1 (180,183). Concretament, en llevats s'havia vist que l'ortòleg de frataxina estimulava específicament la unió del substrat cisteïna amb Nfs1 independentment d'Isu1 o Isd11 (184). Tot i això, estudis amb models de drosòfila i de ratolí amb nivells deficitaris de frataxina, no van mostrar canvis en l'activitat o els nivells de proteïnes amb centres Fe-S com l'aconitasa o la succinat deshidrogenasa, suggerint que la disminució de l'activitat i els nivells de proteïnes Fe-S podria ser un efecte secundari de la malaltia, i no estar directament relacionat amb el dèficit de frataxina (185–188).

Una altra funció, ha suggerit que la frataxina actua com a donadora de ferro en la biosíntesi del grup hemo. L'últim pas de la via de biosíntesi del grup hemo té lloc a la mitocòndria, i implica a l'enzim ferroquelatasa (FECH), que catalitza la inserció del Fe^{2+} a la proteïna protoporfirina IX

per formar el grup hemo. Diversos estudis han demostrat una interacció entre frataxina i ferroquelatasa, i que el dèficit de frataxina provoca la disminució dels nivells del grup hemo, i de l'expressió de components de la síntesi del grup hemo com la mateixa ferroquelatasa (136,137,189,190). Tot i això, en cèl·lules progenitores d'eritròcits de pacients d'atàxia de Friedreich no s'ha vist alteracions en la síntesi del grup hemo (191).

9.4.2. Regulació de mecanismes antioxidants.

Està àmpliament acceptat que l'estrès oxidatiu té un paper fonamental en la patologia de la FRDA. Tant cèl·lules de pacients com models experimentals deficients en frataxina han demostrat la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la presència d'estrès oxidatiu (192–197). Per tant es va proposar com una de les funcions de la frataxina, contribuir a la protecció contra l'estrès oxidatiu. Tot i això, no s'ha determinat si l'estrès oxidatiu és conseqüència directa de la deficiència de frataxina o és un efecte secundari de l'alteració de l'homeòstasi de ferro. Seguint aquesta segona via, l'estrès oxidatiu podria produir-se per l'acumulació de ferro en la mitocondria a través de la reacció de Fenton, on es generaria ROS que a la vegada danyarien els centres Fe-S, alterant encara més el metabolisme del ferro.

Complementant la funció de xaperona, s'ha suggerit que la frataxina tindria funció de detoxificació de ferro (21). S'uniria segrestant el ferro, impedit que quedi lliure en la mitocondria i així evitant que desenvolupi la reacció de Fenton, en la que es generen radicals lliures, limitant el dany oxidatiu del ferro a l'ADN (20). Aquesta funció s'ha vist en llevats però depenent de l'activitat de l'enzim ferroxidasa, que transforma el Fe^{2+} a Fe^{3+} (198). Malgrat això, s'ha vist que algunes cèl·lules de FRDA i models experimentals deficients en frataxina no tenen acumulació de ferro mitocondrial, de manera que la generació de radicals lliures provindria d'altres fonts (135,194). Concretament, s'ha proposat que aquest increment de radicals lliures de l'oxigen es podria generar pel deteriorament dels mecanismes antioxidants de la cèl·lula degut al dèficit de frataxina, causant aquest estrès oxidatiu. En fibroblasts de pacients FRDA i models experimentals deficients de frataxina s'ha detectat que la via Nrf2, que desencadena una resposta antioxidant en condicions d'estrès oxidatiu, es troba alterada (199–201). Per tant, la frataxina podria tenir una funció reguladora dels mecanismes de defensa antioxidants.

En la cadena respiratòria mitocondrial, encarregada de la síntesi energètica d'ATP, es generen ROS com a productes secundaris de les reaccions d'oxidació-reducció. La deficiència de frataxina causa una disfunció de la cadena respiratòria, generant més quantitat de ROS provocant un increment de l'estrès oxidatiu (18). La funció de la frataxina en la cadena respiratòria es detalla més àmpliament a continuació.

9.4.3. Donador d'electrons a cadena respiratòria.

En l'atàxia de Friedreich, la deficiència de frataxina causa afectació majoritàriament en els teixits que requereixen de molta energia i per tant tenen una alta taxa metabòlica. En la cèl·lula l'energia s'obté en les mitocòndries mitjançant la producció d'ATP principalment en la fosforilació oxidativa, com a conseqüència del gradient electroquímic generat del bombeig de protons en l'espai intermembrana de la mitocòndria pels complexos de la cadena transportadora d'electrons (ETC) o cadena respiratòria, mitjançant un conjunt de reaccions de reducció-oxidació, també anomenades redox.

La deficiència de frataxina ha demostrat que causa un descens en l'activitat dels complexos de la ETC i dels nivells d'ATP en cèl·lules derivades de pacients FRDA i en models experimentals (16,202,203). Per aquest motiu, s'ha relacionat la funció de la frataxina amb l'activació de la producció energètica. En models deficients de frataxina o *knock-out*, l'expressió de frataxina recombinant ha demostrat que incrementa el potencial de membrana mitocondrial amb el bombeig protons i per tant activa la fosforilació oxidativa incrementant els nivells d'ATP, suggerint una funció de la frataxina com a activadora de la fosforilació oxidativa (19). A més, en un estudi en llevats es va demostrar que la frataxina interacciona de manera directa amb les subunitats del complex II de la ETC, succinat deshidrogenasa Sdh1p i Sdh2p, i amb les flavoproteïnes ETF α i ETF β que transfereixen els electrons a la quinona oxidoreductasa de la ETC (18). Els complexos I, II, III de la cadena transportadora d'electrons requereixen de centres Fe-S, que aporten electrons. La deficiència de frataxina s'associa amb la incorporació inadequada d'electrons a la cadena respiratòria i la reducció incompleta de la ubiquinona (Q) a l'ubiquinol (QH₂), explicant la pèrdua d'activitat del complex II en el seu paper en la cadena transportadora d'electrons, la reducció de síntesi d'ATP, i conseqüentment, l'acumulació de Fe mitocondrial i la generació d'espècies reactives d'oxigen com la semiquinona pro-oxidant (Q \cdot^-) (ROS) causant estrès oxidatiu. Per tant, la frataxina podria aportar els centres Fe-S als complexos de la cadena respiratòria per produir energia, tot i que no s'ha pogut demostrar en humans la interacció directa de la frataxina amb la succinat deshidrogenasa.

10. Conseqüències del dèficit de frataxina a nivell cel·lular.

Tal com s'ha dit anteriorment, la deficiència de frataxina causa una disfunció de la mitocòndria a través sobretot de l'alteració bioenergètica, del metabolisme del ferro i de l'estat redox, afectant totes les funcions en les que aquest orgànul està implicat en la cèl·lula (165,204). La mitocòndria és un orgànul present en totes les cèl·lules, molt important per aquelles amb un requeriment energètic més elevat. En les cèl·lules del sistema nerviós és essencial pel desenvolupament i manteniment neuronal, la producció d'energia, l'homeòstasi del calci, el manteniment del

potencial de membrana, el plegament de proteïnes, el transport axonal i dendrític, l'alliberament de neurotransmissors en les sinapsis, la regulació de l'estrès oxidatiu i la mort cel·lular per apoptosi (205). Per tant, la implicació d'aquest orgànel en el funcionament cel·lular és tant important que la seva disfunció causa l'atròfia, degeneració i mort cel·lular en la FRDA, de la mateixa manera com s'ha descrit també en altres malalties neurodegeneratives (205).

Els mecanismes patològics generats per la deficiència de frataxina i que contribueixen a la disfunció mitocondrial, com són l'acumulació de dipòsits de ferro, la deficiència d'enzims Fe-S, l'estrès oxidatiu i l'apoptosi, no és manifesten en tots els tipus cel·lulars per igual sinó que alguns són específics de teixit. Únicament s'han detectat tots ells en el cor. Els dipòsits de ferro només s'han trobat en el cor de pacients i models de ratolí (8,135,192). La deficiència dels enzims amb centres Fe-S, més estudiats i amb implicació en l'atàxia de Friedreich, són els complexos de la cadena respiratòria i l'aconitasa. D'aquests, l'aconitasa s'ha vist alterada en el cor de pacients i models de ratolí (16,135,192), però els complexos de la cadena respiratòria tan sols s'han vist alterats en el cor de ratolins MCK *knock-out* condicionals (135). En el sistema nerviós, s'ha detectat una reducció de l'activitat aconitasa però sense canvis en la cadena respiratòria dels DRG de pacients, ratolí *knock-out* condicional i cèl·lules iPS reprogramades a neurones (135,206,207). L'estrès oxidatiu s'ha descrit en tots els òrgans i cèl·lules dels models FRDA (32,64,70,192). En canvi, l'apoptosi únicament s'ha vist en teixits específics de models de ratolí i particularment en cèl·lules β -pancreàtiques i el sistema nerviós (32,70,129). Aquesta mort cel·lular normalment ve precedida per una degeneració cel·lular prèvia. La cèl·lula es col·lapsa a nivell funcional en un estat d'estrès oxidatiu elevat, de manera que s'activen senyals d'apoptosi per desenvolupar la mort programada. Tot i que existeix certa controvèrsia sobre si té lloc l'apoptosi en la malaltia, alguns estudis a partir de mostres de pacients FRDA han vist reducció de les neurones propioceptives dels DRG (34,49) i també de les illes de cèl·lules β del pàncreas (32).

11. Models experimentals de l'atàxia de Friedreich.

El desenvolupament i ús de models experimentals per l'atàxia de Friedreich és fonamental per entendre i caracteritzar a nivell cel·lular i molecular els mecanismes fisiopatològics implicats en la malaltia causats per la deficiència de frataxina, i molt importantment, per poder avaluar l'eficàcia de teràpies per tractar la patologia. Els tractaments que es desenvolupen, han d'haver-se testat prèviament en models cel·lulars o animals per comprovar-ne l'eficiència i la seguretat, i per poder ser aprovats com a teràpies potencials per als pacients.

L'alta conservació de la proteïna frataxina en l'evolució, ha permès utilitzar i desenvolupar un ampli rang d'organismes diferents com a model d'atàxia de Friedreich que van des de models unicel·lulars fins a organismes pluricel·lulars, i inclús línies cel·lulars obtingudes directament

dels pacients. Aquests han servit per investigar característiques concretes relacionades amb la malaltia, però actualment, cap dels models desenvolupats per l'atàxia de Friedreich ha aconseguit reproduir, en la seva totalitat, els mecanismes cel·lulars afectats i els símptomes fisiopatològics de la malaltia.

11.1. Models de llevat.

Els llevats són organismes eucariotes unicel·lulars àmpliament utilitzats i caracteritzats com a models ja no sols per l'atàxia de Friedreich, sinó per d'altres malalties o altres aspectes donada la seva facilitat de manipulació en cultiu *in vitro* i a nivell genètic.

En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) es va trobar un gen homòleg al gen humà *FXN*, que es va anomenar *Yfh1* (de l'anglès yeast frataxin homologue 1) que codificava per una proteïna homologa a la frataxina (Yfh1) que tenia localització mitocondrial. Per tal de determinar l'efecte de la manca d'aquesta proteïna en el llevat a nivell cel·lular, se'n va extreure el gen *Yfh1* ($\Delta yfh1$), i es va observar que la falta de la proteïna alterava la homeòstasi del ferro mitjançant l'acumulació de ferro en l'interior de la mitocòndria, juntament amb una sobreexpressió de les proteïnes relacionades amb el transport de ferro Ftr1 i Fet3, estrès oxidatiu i acumulació d'espècies reactives d'oxigen, la reducció d'activitat d'enzims Fe-S i la reducció de la funció respiratòria degut al descens d'activitat del citocrom c oxidasa (133,208–214).

L'expressió de frataxina humana en un model *knock-out* de la proteïna frataxina de llevat ($\Delta yfh1$) va demostrar que restablí l'homeòstasi del ferro i el dany oxidatiu associat a la manca de Yfh1, i que per tant, ambdós proteïnes frataxina realitzaven una funció similar en cadascun dels organismes (210,215).

La generació d'un model de llevat *knock-out* condicional, en el qual es va induir la depleció de frataxina modificant el promotor endogen amb un del gen *Yfh1* amb un promotor TetO i mitjançant l'addició de doxiciclina en el medi de cultiu, va permetre realitzar un estudi temporal de la deficiència de frataxina, en que es va determinar l'ordre d'inici de la patologia. En estadis inicials de la depleció de frataxina en el llevat, el primer que apareix és l'acumulació de ferro en la mitocòndria. Posteriorment, l'estrès oxidatiu caracteritzat per la reducció de l'activitat de l'enzim superòxid dismutasa i l'increment de la formació de proteïnes carbonilades, i seguidament la reducció dels nivells i l'activitat de l'aconitasa o proteïnes Fe-S, cosa que va suggerir que es tractava d'un efecte secundari de l'acumulació de ferro. Finalment, com a conseqüència de la deficiència dels enzims Fe-S, la mesura de la taxa del consum d'oxigen va indicar que els nivells i activitat dels complexos I, II, III de la cadena respiratòria d'electrons, dependents d'aquestes proteïnes Fe-S, comencen a créixer únicament després de l'acumulació de ferro mitocondrial (188,216).

La majoria d'estudis amb llevats s'han fet amb *S. cerevisiae*, però també s'ha utilitzat el model de llevat *Schizosaccharomyces pombe*, on eliminant l'homòleg de frataxina *pfh1* s'ha trobat els mateixos efectes que en *S. cerevisiae* (217). Interessantment, en un altre model *S. pombe* l'alta sobreexpressió de l'homòleg frataxina *pfh1* va demostrar tenir efectes adversos pel llevat, amb la inhibició del creixement, afectació de la integritat de la membrana mitocondrial i alteració de la respiració cel·lular. Malgrat això, els nivells de les defenses antioxidants i l'activitat dels enzims Fe-S es va veure incrementada, suggerint que la frataxina regula l'eficiència de la biosíntesi dels centres Fe-S (218).

11.2. Models cel·lulars.

Com a models cel·lulars humans de l'atàxia de Friedreich s'han utilitzat principalment cultius primaris de cèl·lules de pacients amb atàxia de Friedreich, o línies cel·lulars immortalitzades a les quals se'ls ha induït la deficiència de frataxina.

Els cultius primaris de pacients més àmpliament utilitzats són els fibroblasts de la pell o els limfòcits perquè són cèl·lules accessibles, de fàcil extracció, sense causar dany o posar en perill al pacient. En el cas de l'atàxia de Friedreich aquestes cèl·lules contenen la mutació amb l'expansió en homozigosi de les repeticions GAA en l'intró 1 del gen *FXN*, tenen el locus complet del gen incloent les pròpies seqüències reguladores, i presenten nivells deficients de la proteïna frataxina. Malgrat això, tant els fibroblasts com els limfòcits no són els tipus cel·lulars més afectats en la malaltia i per tant no mostren un fenotip patològic complet de la malaltia, mancant per exemple l'increment de ferro en la mitocondria que si s'observa en altres models (16,219). És per això que s'han utilitzat principalment per caracteritzar la regulació del gen *FXN* en la malaltia determinant les causes del silenciament transcripcional degut a la mutació, per avaluar tractaments que indueixin l'expressió de frataxina com inhibidors d'histones deacetilases que actuen de moduladors de l'heterocromatina (220–222), i per trobar biomarcadors de la malaltia (223,224). Però també s'han utilitzat per avaluar les conseqüències patològiques del dèficit de la proteïna frataxina com l'afectació del citoesquelet (225), del metabolisme energètic (226,227), i un increment de l'estrès oxidatiu que altera la viabilitat cel·lular i per tant també són adequades per provar tractaments amb antioxidants (196,199,219,228–233). Idealment, les cèl·lules de pacients més interessants per estudiar serien les neurones, els cardiomiòcits o les cèl·lules β -pancreàtiques, però malauradament són menys inaccessibles. Per aquest motiu, posteriorment s'han generat cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs), obtingudes a partir de la reprogramació de cèl·lules somàtiques de pacients FRDA com fibroblasts. Aquestes cèl·lules mantenen la mutació de l'expansió GAA en el gen *FXN*, tenen deficiència dels nivells d'ARNm i proteïna frataxina, i poden diferenciar-se a altres tipus cel·lulars com neurones o cèl·lules cardíques tenint un model amb una patologia més similar a la malaltia. Les iPSC de FRDA diferenciades mostren disfunció

mitocondrial i disminució del potencial de membrana (206,234,235). S'han utilitzat per estudiar les conseqüències de la deficiència de frataxina i per avaluar tractaments en cultiu *in vitro* (236–240). Malgrat tot, tampoc mostren exactament la patologia descrita en els pacients FRDA, ja que no exhibeixen dèficits en les activitats dels enzims Fe-S.

Com a model cel·lular FRDA s'han utilitzat cèl·lules que no deriven de pacients, sinó que són línies cel·lulars immortalitzades a les que se'ls ha induït la deficiència de frataxina utilitzant ARNs d'interferència o ribozims. S'han utilitzat HeLa, T-Rex-293, oligodendrogloma o neuroblastoma entre d'altres. Tot i ser models cel·lulars humans i algun d'ells neurones, on la majoria mostren defectes en l'activitat aconitasa, tenen acumulació de ferro, mort apoptòtica, alteració del metabolisme del calci, entre altres, tenen l'inconvenient que són cèl·lules immortalitzades, molt diferents a les cèl·lules afectes dels pacients, i per tant presenten canvis genètics que poden alterar-ne el fenotip i no mimetitzar correctament les característiques de la malaltia. A més, la diversitat dels ARNs d'interferència utilitzats tenen una estabilitat i capacitat per inhibir l'expressió de frataxina diferents causant diferents graus de patologia, dificultant la reproductibilitat entre estudis (48,241–245).

També s'ha utilitzat cultius primaris de cèl·lules provinents de teixits d'individus sans, on l'afectació patològica és més severa, com neurones, cardiomiòcits o cèl·lules pancreàtiques a les quals se'ls hi ha silenciada l'expressió de frataxina mitjançant l'ús d'ARN d'interferència (ARNi) per mimetitzar la malaltia. En cultius primaris de DRG es va demostrar que el silenciament de frataxina disminueix el potencial de membrana, altera l'homeòstasi del calci i causa degeneració de les neurites i mort per apoptosi (246). En cultius primaris de cardiomiòcits deficients en frataxina es va mostrar sensibilitat elevada al dany oxidatiu juntament amb la sobreexpressió d'enzims antioxidants, una xarxa mitocondrial desorganitzada i la presència de gotes lipídiques. Tot i això, no van evidenciar alteracions en els nivells de ferro ni en les proteïnes relacionades Fe-S (194). Altrament, s'han utilitzat altres models de cultius primaris de neurones corticals, astròcits i cèl·lules β -pancreàtiques on s'ha silenciada l'expressió de frataxina amb ARNs d'interferència per estudiar els efectes de la deficiència de frataxina (247–249).

En els darrers anys, s'han utilitzat tècniques TALEN (nucleases efectores de tipus activador de la transcripció) i CRISPR (repeticions palindròmiques curtes agrupades i regularment interespaïades) per editar el genoma específicament i incrementar l'expressió de la proteïna frataxina de línies cel·lulars. En cèl·lules HEK293 *knock-out* pel gen endogen de frataxina, es va integrar el gen frataxina induït per tetraciclina mitjançant TALEN i CRISPR, per així regular l'expressió de frataxina en el temps (250).

11.3. Models invertebrats.

El nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) s'ha utilitzat àmpliament com a model per moltes malalties principalment per la seva facilitat de manipulació genètica. Per l'atàxia de Friedreich, al *C. elegans* se li va silenciar l'expressió de frataxina utilitzant ARNi i es va observar una major sensibilitat a l'estrès oxidatiu i alteració en la respiració que afectava al temps de vida dels cucs (251,252). Utilitzant aquest model, s'ha proposat que la frataxina té un paper en la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria (253), i que la deficiència de frataxina indueix autofàgia en resposta a la disfunció mitocondrial (254,255).

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* també s'ha utilitzat àmpliament com a model invertebrat pels seus avantatges com la facilitat de manipulació genètica, manté processos biològics conservats amb els humans, el seu manteniment és senzill i econòmic, i perquè tenen un cicle de vida curt, i per tant de reproducció molt ràpida podent obtenir fàcilment una gran quantitat de mosques model en poc temps. Malgrat que és un animal molt distanciat evolutivament dels humans, conté el gen homòleg de la frataxina (*fh*), tot i que més simple, amb únicament dos exons separats per un intró (256). Com a model d'atàxia de Friedreich s'ha utilitzat principalment per estudiar la funció de la frataxina, els mecanismes patològics, l'avaluació de teràpies i estudis de sobreexpressió de frataxina (257). Inicialment, es va silenciar l'expressió del gen endogen *fh* utilitzant ARN d'interferència a nivells molt baixos d'expressió afectant severament la mitjana de vida de les mosques (258). Posteriorment, per tal de tenir una representació més similar de la malaltia, es va reduir l'expressió de *fh* a un terç del total o bé únicament en teixits determinats, sense afectar la mitjana de vida de les mosques permeten el seu desenvolupament a fase adulta (185,259–266). Diversos estudis de sobreexpressió de frataxina han demostrat toxicitat en models de drosòfila (185,267–269). La drosòfila també s'ha utilitzat com a model per caracteritzar la cardiomiopatia de la FRDA i avaluar tractaments relacionats. La deficiència de frataxina en les mosques s'ha vist que altera la funció sistòlica i la dilatació cardíaca de manera similar als pacients. Un estudi que utilitza el compost blau de metilè, que actua en la cadena transportadora d'electrons de les mitocòndries, millora la disfunció cardíaca (265). La deficiència de frataxina en motoneurons de larves ha demostrat una reducció del potencial de membrana mitocondrial i defectes en el transport axonal dels mitocondris (262). L'homeòstasi del ferro també s'ha vist alterada, amb acumulacions de ferro en la mitocòndria, alteració dels enzims Fe-S, una disminució en la producció d'ATP i increment de síntesi d'esfingolípids, activant les vies de Pdk1 i Mef2, que s'ha demostrat que indueixen neurodegeneració en mamífers (185,260,263,270). El tractament amb quelants de ferro com deferiprona i deferoxamina milloren el procés transitori de larva a crisàlide, la funció motora i la vida mitjana de les mosques deficientes en frataxina (263,266). Els tractaments amb antioxidants com la idebenona han mostrat tenir efectes beneficiosos, així

com la rapamicina, inhibidor del complex TORC1, que millora la coordinació motora i la vida mitjana de les mosques (258–260,263–265,271).

11.4. Models de ratolí.

El ratolí és un dels models animals experimentals més utilitzat perquè són mamífers, evolutivament més pròxims als humans, anatòmicament semblants, comparteixen tipus cel·lulars, tenen molta similitud a nivell de genoma, proteoma, i realitzen les mateixes funcions biològiques i moleculars en les cèl·lules. La seva petita mida i cicle de reproducció curt han fet que siguin fàcils de manipular, criar i obtenir un número adequat per poder realitzar estudis experimentals. Per l'atàxia de Friedreich són diversos els models de ratolí que s'han desenvolupat, tots amb l'objectiu de mimetitzar els efectes fenotípics de la patologia humana, però malauradament, fins la data no s'ha aconseguit generar cap model que reproduïxi conjuntament tots els símptomes patològics, en cadascun dels teixits, ni que tingui la progressió ni afectació fenotípica que tenen els pacients d'atàxia de Friedreich.

En els ratolins, el gen de la frataxina de ratolí (*Fxn*) es troba en el cromosoma 19 i codifica per una proteïna frataxina de 207 aminoàcids, de mida similar a la frataxina humana i amb una identitat del 73% respecte aquesta. A més, la frataxina de ratolí també conté la regió N-terminal que la dirigeix a la mitocòndria (132). En el ratolí adult, l'expressió d'ARNm de frataxina s'ha detectat al cor, fetge, múscul esquelètic, medul·la espinal, ganglis de l'arrel dorsal, ronyó, melsa, timus, teixit adipós, pell; i menor expressió en cervell, pulmons. Del sistema nerviós on més expressió s'ha detectat és en la medul·la espinal i els ganglis de l'arrel dorsal (132). Per tant, el ratolí té una distribució de frataxina similar als humans.

El primer model de ratolí FRDA que es va crear va ser el ratolí *knock-out* pel gen endogen *Fxn* (*Fxn*^{-/-}) en el qual la deleció de frataxina és completa. Aquest ratolí presentava letalitat embrionària, concretament en el dia E6.5, demostrant el paper essencial que exerceix la frataxina en el desenvolupament embrionari (129). Per evitar la mort embrionària es van generar models *knock-out* condicionals específics de teixit amb el sistema de recombinació Cre-LoxP. Amb aquest sistema, es va flanquejar l'exó 4 del gen endogen de frataxina del ratolí amb seqüències LoxP, per a que la recombinasa Cre reconegui aquestes seqüències i interrompi el gen *Fxn* únicament en aquelles cèl·lules que l'expressin, i per tant elimini completament l'expressió de frataxina, esdevenint *knock-out*. L'expressió de la recombinasa Cre va ser regulada pels promotors específics de la creatina quinasa de múscul (MCK) i de l'enolasa específica de neurones (NSE), obtenint dos models de ratolí, que són condicionals perquè s'elimina per complet l'expressió de frataxina, únicament en aquelles cèl·lules on s'expressi MCK i NSE. Es van utilitzar aquests promotors perquè es volia obtenir dos models viables de ratolí que reproduïssin

la cardiomiopatia i la neurodegeneració causant de l'atàxia, ambdós principals símptomes patològics de la malaltia. El model MCK, que conté el promotor creatina quinasa de múscul (MCK), específic de múscul estriat, és *knock-out* per la frataxina principalment en les cèl·lules cardíques i múscul esquelètic i per tant permet l'estudi de la cardiomiopatia; i el model NSE, amb promotor de l'enolasa específica de neurones (NSE), específic neuronal, permet estudiar la neurodegeneració del sistema nerviós (135). El ratolí MCK presenta hipertròfia cardíaca i dipòsits de ferro a partir de les 7 setmanes d'edat. El ratolí NSE té un fenotip patològic molt agressiu que afecta la durada de vida a aproximadament de 24 dies, té absència de frataxina en teixits neuronals i també en cor i fetge, manifesta atròfia progressiva espinocerebral i sensorial, però conté regions atrofiades del sistema nerviós central que no es troben afectades en pacients humans com lesions espongiformes al còrtex. Ambdós models reproduïxen les característiques fisiopatològiques i bioquímiques més importants de la malaltia humana, que són la hipertròfia cardíaca i l'atàxia progressiva amb pèrdua de la propiocepció, respectivament; i deficiència de les activitats de proteïnes de la cadena respiratòria d'electrons i aconitasa. Malgrat això, presenten inconvenients com l'excessiva severitat fenotípica i la presència de signes no específics de la FRDA, sobretot en el model neuronal NSE, degut a que els promotors no són suficientment específics i a que es suprimeix l'expressió de frataxina, de manera prematura, en altres cèl·lules i teixits on en humans no hi ha afectació (135).

Per a aconseguir un bon model en sistema nerviós es va generar un nou ratolí KO condicional mitjançant el sistema de recombinació Cre-loxP amb el promotor de la proteïna priònica de ratolí (PRP) i induïble amb tamoxifè. Es van obtenir dues línies de ratolins anomenades Br (cervell) i Cb (cerebel), ambdós amb una expressió reduïda de frataxina en el cerebel, però únicament el model Br presentava una disminució de la frataxina en la medul·la espinal i el cervell. Aquest model mostrava atàxia sensitiva i cerebel·losa, amb pèrdua de la propiocepció i autofàgia en les neurones sensorials grans dels DRG a les 10 setmanes d'edat. En canvi, no mostrava defectes motors i inconvenientment també presentava signes no característics de la FRDA (272).

Donat que alguns pacients amb atàxia de Friedreich poden desenvolupar diabetis, es van generar models condicionals de ratolí per suprimir la frataxina endògena específicament en cèl·lules β -pancreàtiques. Es va utilitzar també el sistema recombinasa Cre-LoxP, on la recombinasa Cre estava regulada sota el control del promotor 2 d'insulina de rata (Ins2). El resultat va ser un ratolí amb intolerància a la glucosa a partir de les 6 setmanes, que progressa fins desenvolupar diabetis mellitus degut a la pèrdua de cèl·lules β -pancreàtiques. Es va detectar també alts nivells d'espècies reactives d'oxigen en els illots pancreàtics i increment de l'apoptosi (70).

Es va generar un model de ratolí condicional específic per suprimir l'expressió de frataxina en el fetge, perquè malgrat no estar afectat en l'atàxia de Friedreich, és un òrgan important en l'homeòstasi del ferro, i d'aquesta manera se'n pot estudiar les alteracions causades per la

deficiència de frataxina. En aquest cas, es va utilitzar el promotor de l'albumina per expressar la recombinasa Cre. El ratolí que es va obtenir presentava acumulació de greix al fetge a les 4 setmanes d'edat, concretament de gotes lipídiques en l'interior dels hepatòcits, amb alteracions mitocondrials, defectes d'enzims Fe-S i la majoria morien aproximadament a les 8 setmanes d'edat (273).

Donat que l'eliminació total de frataxina específicament en els teixits que estan afectes en l'ataxia de Friedreich en ratolins no reproduïen correctament la patologia, es van desenvolupar models introduint les expansions patològiques GAA en l'intró 1 del gen endogen *Fxn* dels ratolins per a tots els teixits amb l'objectiu que crear el mateix efecte que en els pacients FRDA, és a dir, aconseguir una deficiència de la proteïna frataxina de ratolí mitjançant el silenciament gènic i així obtenir ratolins que manifestin un fenotip patològic similar als humans. Es va generar el model de ratolí KIKI fent un *knock-in* de l'expansió trinucleòtida GAA, concretament, introduint en homozigosi 230 repeticions patològiques GAA en l'intró 1 del gen endogen murí de *Fxn* ($Fxn^{230GAA/230GAA}$). Aquest model presentava uns nivells d'expressió de frataxina entre 66-83% respecte els nivells endògens d'un ratolí salvatge WT, molt elevats si es comparen amb els nivells que expressen els pacients FRDA (274). Posteriorment, aquest ratolí KIKI es va creuar amb un ratolí heterozigot pel *knock-out* del gen endogen *Fxn*, per generar un model de ratolí KIKO, amb un al·lel del gen *Fxn* murí amb l'expansió de 230 repeticions GAA i l'altre al·lel *knock-out*, amb el gen interromput i per tant sense possibilitat d'expressar-se. D'aquesta manera, es va obtenir un model que expressava uns nivells de frataxina molt més baixos, entre 25-36% respecte els nivells endògens d'un ratolí salvatge WT. Malgrat això, inicialment no es va detectar afectació fenotípica ni a nivell neurològic ni cardíac, sense alteracions en la coordinació motora ni el metabolisme del ferro (274). En estudis posteriors, es van detectar canvis en el perfil d'expressió gènica en la medulla espinal, alteracions en la via del receptor activador de la proliferació de peroxisomes (PPAR- γ) que regula el metabolisme lipídic en el cor i múscul esquelètic (226,275), dèficits en la biogènesi mitocondrial i disminució de les activitats i els nivells dels complexos de la cadena respiratòria en el cerebel en estadis precoços de desenvolupament (276). Recentment, utilitzant nous tests de neurocomportament específics s'ha detectat un fenotip atàxic, pèrdua sensorial perifèrica, i disminució de la força i resistència muscular a partir dels 8 mesos d'edat (277).

Els ratolins tenen els introns del gen *Fxn* menys conservats respecte els humans que els exons perquè no codifiquen per la síntesi de proteïnes, i per tant han rebut menys pressió evolutiva. L'inconvenient que existeix per aquests models *knock-in* és que l'intró 1 del gen de frataxina de ratolí no conté repeticions GAA perquè aquestes es troben dins d'una seqüència Alu en el gen humà, que evolutivament va aparèixer a partir dels primats. Per tant, la inclusió d'una expansió de repeticions GAA en l'intró 1 del gen *Fxn* no sé sap quin efecte té en el context genòmic, de regulació i expressió del gen frataxina i en el conjunt cel·lular.

Tenint en compte aquesta aproximació es van generar models de ratolí transgènics humanitzats YG8 i YG22, en els quals se'ls hi va introduir mitjançant un cromosoma artificial de llevat (YAC) el gen complet de *FXN* humà amb les expansions patològiques GAA (278,279). El ratolí transgènic YG8 conté dues còpies en tàndem del gen *FXN* humà, ambdues amb expansions patològiques del trinucleòtid GAA, concretament de 90 i 190 repeticions. El ratolí YG22 conté una única còpia del gen *FXN* humà amb 190 repeticions GAA. Aquests ratolins es van anar creuant amb ratolins heterozigots *knock-out* pel gen endogen de ratolí *Fxn* fins obtenir ratolins *knock-out* homozigots pel gen endogen *Fxn*, que eren embriològicament letals, rescatats amb el gen *FXN* humà amb l'expansió patològica GAA. El gen *FXN* humà, tot i contenir la mutació patològica, produeix suficient frataxina humana, permetent el desenvolupament embrionari i obtenint el model de ratolí transgènic YG8R i YG22R (R de rescatat), a partir dels ratolins YG8 i YG22 (192). Per tal de poder comparar aquests models de ratolins, es va generar un ratolí transgènic control que és *knock-out* pel gen endogen *Fxn* murí i conté el gen humà *FXN* amb 9 repeticions GAA no patològiques. En les línies YG8R i YG22R s'ha vist que l'expansió GAA produeix el mateix efecte de silenciament gènic i inhibició de la transcripció que en els pacients FRDA, mostrant nivells de frataxina més baixos en alguns teixits. Aquests ratolins tenen un fenotip patològic progressiu semblant als pacients amb atàxia de Friedreich però lleu, caracteritzats per atàxia, defectes locomotors, degeneració moderada de les neurones sensibles dels ganglis de l'arrel dorsal, alteracions bioquímiques i lleugers signes d'estrès oxidatiu, essent més sever en el model YG8R que el YG22R (192).

Actualment, el ratolí YG8R és el model FRDA que millor mimetitza l'atàxia de Friedreich malgrat mostrar una patologia moderada, és el més ben caracteritzat i el més utilitzat en estudis preclínics i funcionals. Per aquest motiu, és el model que s'ha escollit per a realitzar aquest estudi i avaluar l'eficiència de la teràpia gènica amb vectors adenoassociats. El model es detalla més àmpliament en l'apartat 0.

Possiblement, el fenotip patològic moderat d'aquests ratolins sigui degut a que el número de repeticions no sigui prou gran, silenciant poc el gen *FXN* i en conseqüència tenint una deficiència no prou severa de la proteïna frataxina. En humans s'ha descrit la correlació de que pacients amb més repeticions GAA tenen un fenotip patològic molt més sever (280). És per aquest motiu que mitjançant el creuament continuat de la línia YG8R entre si, es va generar el model de ratolí transgènic YG8sR (s, de single), que és *knock-out* pel gen *Fxn* endogen murí i transgènic amb una única còpia del gen *FXN* humà amb l'expansió patològica de 230 repeticions GAA. El creuament successiu entre ratolins YG8R ha fet que es perdés la còpia del gen *FXN* amb les repeticions curtes, i donada la inestabilitat intergeneracional de les repeticions GAA, es va aconseguir incrementar el número de repeticions de 190 a 230. Aquest model de ratolí va demostrar tenir menys expressió de frataxina, i un fenotip patològic progressiu moderat similar a

la FRDA, però més sever que el ratolí YG8R (281). Malauradament, la severitat del fenotip, tot i incrementar una mica, segueix essent massa moderada, és per això que actualment, per tal d'incrementar aquesta severitat patològica s'està desenvolupant el mateix tipus de ratolins amb un número més elevat de repeticions GAA.

A partir dels ratolins YG8R, es va generar un model de FRDA *knock-down* induïble i sistèmic que controla l'expressió de frataxina permetent realitzar un estudi temporal i estudiar els efectes de la reversió de frataxina. Concretament, es va aconseguir reduir l'expressió de frataxina en els ratolins YG8R mitjançant la introducció d'un transgèn que conté un ARNsh que s'expressa en presència de doxiciclina, i que sintetitza un ARN d'interferència específicament dirigit contra l'ARNm de frataxina, evitant la síntesi de proteïna. Com a conseqüència s'obté un ratolí, que malgrat tenir una mitjana de vida únicament d'unes 25 setmanes, i per tant precoç, manifesta un fenotip similar als pacients FRDA, caracteritzat per dèficits motors, degeneració dels DRG, cardiomiopatia progressiva amb acumulació de dipòsits de ferro, alteracions en l'organització dels sarcòmers i mitocòndries amb morfologia anormal (282).

Recentment, s'ha generat un model de ratolí *knock-out* condicional Pvalb Fxn-cKo que té un al·lel *knock-out* del gen endogen *Fxn* de ratolí i l'altre al·lel conté seqüències *LoxP* flanquejant l'exó 2 del gen *Fxn* en totes les cèl·lules. A més té un al·lel *knock-in* que expressa la recombinasa Cre quan s'expressa la parvalbúmina (Pvalb-Cre). Per tant el ratolí Pvalb Fxn-cKo té un genotip heterozigot compost pel gen frataxina endogen i heterozigot per l'al·lel *knock-in* amb Pvalb-Cre. En aquest model de ratolí, les cèl·lules que expressen parvalbúmina, principalment neurones, interneurons del cervell, neurones sensibles propioceptives i aferents dels ganglis de l'arrel dorsal, cèl·lules Purkinje del cerebel i nucli dentat, sintetitzen la proteïna recombinasa Cre, que reconeix els llocs *loxP* que flanquegen l'exó 2, interferint el gen *Fxn* i impeding la síntesi de la proteïna frataxina en aquestes neurones. Per tant, aquelles cèl·lules que expressen parvalbúmina són completament *knock-out* per la frataxina. El resultat és un model de ratolí amb un fenotip precoç i sever de la malaltia que apareix aproximadament a les 9-10 setmanes d'edat i que està caracteritzat per una atàxia sensitiva progressiva, neuropatia amb pèrdua del reflex sensorimotor H, defectes en les neurones propioceptives i que té una mort prematura aproximadament a les 20 setmanes d'edat deguda a episodis epilèptics (283). Tot i mostrar característiques patològiques típiques de l'atàxia de Friedreich, sobretot a nivell sensitiu, en les neurones dels DRG i el nucli dentat del cerebel, és un model amb una patologia molt agressiva de ràpida progressió, que també té afectació en el cervell, i que per tant, no mimetitzava correctament la malaltia.

11.4.1. Model de ratolí YG8R.

En aquest estudi en que es vol avaluar un tractament amb teràpia gènica basada en vectors virals adenoassociats per a l'atàxia de Friedreich a nivell preclínic, s'ha escollit com a model animal experimental el ratolí transgènic hemizigot YG8R (YG8R Tg/-) (192). Aquest ratolí, tal com s'ha explicat breument en l'apartat 11.4, a nivell genètic és *knock-out* per ambdós al·lels pel gen endogen *Fxn*, i transgènic amb dues còpies en tàndem del gen humà *FXN* que contenen l'expansió patològica GAA, amb 90 i 190 repeticions del triplet en l'intró 1 del gen. Per tant, únicament sintetitza proteïna frataxina humana a partir del transgèn (192,278). S'ha vist que les repeticions GAA tenen inestabilitat intergeneracional, somàtica i dependent d'edat, per tant el número de repeticions GAA pot variar en la descendència, en funció de l'edat i del teixit, essent superior en el sistema nerviós central, i particularment en el cerebel, de manera similar a l'atàxia de Friedreich (284). S'ha descrit que l'expansió patològica GAA en cèl·lules del cervell, cerebel i cor de ratolins YG8R causa canvis epigenètics en el gen *FXN* similars als pacients, caracteritzats per un increment de la metilació de l'ADN en les illes CpG i modificacions d'histona en regions flanquejants de les repeticions GAA (285).

El ratolí en general presenta un fenotip patològic progressiu però lleu. A nivell neurològic té dèficits de coordinació motors aproximadament a partir dels 4-6 mesos d'edat, juntament amb una reducció progressiva de l'activitat locomotora i de la força muscular. S'ha detectat l'increment de dipòsits de lipofuscina, com a resultat de l'estrès oxidatiu, i grans vacuoles en les neurones dels ganglis de l'arrel dorsal sobretot a nivell lumbar a partir dels 9 mesos d'edat, i a nivell cervical després dels 12 mesos d'edat. Les arrels lumbar presenten desmielinització dels axons grans. Als 12 mesos d'edat s'ha detectat acumulació de ferro en els cardiomiòcits com a característica comuna de la cardiomiopatia present en els pacients amb FRDA. Manifesten increment de pes, intolerància a la glucosa i hipersensibilitat a la insulina. A nivell bioquímic, tenen reducció en l'activitat de l'enzim aconitasa i els complexos de la cadena transportadora d'electrons en alguns teixits a partir dels 6 mesos d'edat, i estrès oxidatiu en cervell, cerebel, cor i múscul esquelètic (192,281,286,287). Estudis posteriors han demostrat l'aparició dels dèficits de coordinació motora aproximadament entre els 3 i 4 mesos d'edat (288,289). S'ha observat mort neuronal retrògrada que s'inicia en les arrels dorsals i les neurones dels DRG de manera similar a la patologia humana, sense afectació en la medulla espinal, degeneració axonal amb defectes en la mielina per dany en les cèl·lules de Schwann; senescència dels illots de Langerhans, i disminució de les cèl·lules β en el pàncreas (289). S'ha demostrat disfunció mitocondrial caracteritzada per la disminució de proteïnes de la cadena transportadora d'electrons i la fosforilació oxidativa, i deficiència d'enzims antioxidants en els DRG (290). A més, neurones extrems dels ratolins van mostrar desregulació mitocondrial causada per la reducció del potencial de membrana mitocondrial degut a la inhibició del complex I de la cadena respiratòria, provocant

la generació d'espècies reactives d'oxigen i l'increment de la peroxidació lipídica (63). En un altre estudi es va detectar vacuolització en les neurones dels DRG, disminució del número de neurones grans de la columna de Clarke de la medulla espinal, i alteració de la mida de les neurones grans del nucli dentat del cerebel (288) (**Taula 4**). Possiblement, la severitat moderada d'aquest model de ratolí sigui deguda a que el número de repeticions GAA que conté, de 90 i 190, sigui baix comparat amb el que poden arribar a tenir els pacients amb FRDA. Si bé s'ha descrit que aquest número de repeticions GAA són suficients per causar la malaltia en humans, també s'ha descrit que el número de repeticions GAA correlaciona amb la severitat i evolució de la malaltia en els pacients. De manera que com més repeticions GAA es tingui més sever serà el fenotip patològic (27,31,66,94–96).

Fins la data aquest model de ratolí s'ha utilitzat per estudiar els aspectes genètics de la malaltia com la inestabilitat de les repeticions GAA (278), el silenciament gènic induït per l'expansió (291), i s'han provat la teràpia gènica utilitzant la tecnologia CRISPR-Cas9 per eliminar l'expansió de les repeticions GAA i restablir l'activitat transcripcional i els nivells de proteïna frataxina (292).

La descendència del creuament entre ratolins transgènics hemizigots YG8R podria donar lloc a ratolins amb tres genotips diferents, tots ells en un fons genètic *knock-out* pel gen endogen murí *Fxn* i que es diferencien en funció del número de còpies del transgèn que hereten. Per tant, es poden obtenir ratolins homozigots (Tg/Tg) amb dues còpies del transgèn humà, és a dir 4 còpies del gen de *FXN* humà; i ratolins hemizigots (Tg/-) amb una sola còpia del transgèn humà i per tant amb 2 còpies del gen humà de frataxina. Un altre genotip que és podria generar no tindria el casset transgènic, però l'absència de frataxina no permet el desenvolupament embrionari del ratolí, i per tant no neix.

Tot i considerar-se un model deficient en frataxina, en diversos estudis s'han detectat nivells elevats de frataxina humana, sobretot en teixits del sistema nerviós, que arriben a ser inclús superiors als nivells del ratolins WT (287,289). La raó de perquè malgrat tenir aquests nivells els ratolins YG8R hemizigots mostren la patologia no està clara. Podria ser degut a una ineficiència funcional de la frataxina humana en les cèl·lules de ratolí a causa de les variacions que s'han determinat en la seqüència de la forma madura respecte la frataxina de ratolí. També s'ha suggerit que el perfil d'expressió del transgèn humà podria estar regulat per diferents factors i de manera independent a la frataxina endògena murina depenent del tipus cel·lular (287). Malgrat això, hi ha estudis que han demostrat que els ratolins YG8R homozigots pel transgèn, produeixen pràcticament el doble de frataxina humana que els ratolins hemizigots i mostren un fenotip i una patologia menys afecta, similars als WT (200,289). De manera que un tractament que incrementi els nivells d'expressió de frataxina humana en els ratolins YG8R hemizigots, podria

potencialment millorar les característiques fenotípiques i patològiques de l'atàxia de Friedreich que té aquest model.

Fenotip	YG8R (Edat d'aparició o detecció)
Nº còpies del gen <i>FXN</i>	2
Repeticions GAA	90 + 190
Descoordinació motora	3-6 mesos
Reducció de l'activitat locomotora	4-5 mesos
Alteració de la marxa	9-12 mesos
Disminució de l'equilibri i l'estabilitat	A partir d'entre 6-9 mesos
Neuropatia sensitiva	9-20 mesos
Reducció de la força muscular	A partir dels 7 mesos Progressiva
Neurodegeneració de les neurones dels DRG	9-12 mesos
Reducció de neurones en la columna de Clarke de la medulla espinal	9 mesos
Neuropatologia en el nucli dentat del cerebel	9 mesos
Morfologia axonal anormal i desmielinització	20 - 24 mesos
Cromatòlisis i dipòsits de lipofuscina en els DRG	20 mesos
Morfologia anormal de les fibres del miocardi	20 mesos
Acumulació de dipòsits de ferro	20 mesos
Increment de pes	Si
Intolerància a la glucosa	Als 12 mesos d'edat
Disminució de cèl·lules β -pancreàtiques	24 mesos
Funció mitocondrial	Reduïda (~75% en cor als 6 mesos)
Activitat aconitasa	Reduïda (66% en cor als 6 mesos)
Estrès oxidatiu	6-9 mesos

Taula 4. Resum de les característiques patològiques descrites del model de ratolí transgènic hemizigot YG8R (192,287–289).

12. Aproximacions terapèutiques.

En l'actualitat no es disposa d'una teràpia efectiva per tractar, aturar o revertir la progressió de tots els signes clínics de l'atàxia de Friedreich. Si més no, alguns dels símptomes i complicacions puntuals de la malaltia poden tractar-se per ajudar els pacients a mantenir un funcionament òptim i una millor qualitat de vida el major temps possible. Entre els tractaments de les afectacions que es poden tractar en l'atàxia de Friedreich és important destacar la fisioteràpia o rehabilitació, que són útils per a perllongar l'ús i funcionalitat dels braços i cames (293,294). Els problemes ortopèdics com les deformitats dels peus i l'escoliosi poden tractar-se amb aparells correctors o cirurgia en els casos més avançats o extrems. La diabetis, quan està present, pot tractar-se amb dieta i medicaments com la insulina, i alguns dels problemes del cor també poden tractar-se amb fàrmacs. No obstant, no existeix cap teràpia efectiva per tractar estrictament la neuropatologia, la qual és el principal símptoma de la malaltia, que afecta de manera molt severa la qualitat de vida i autonomia dels pacients amb atàxia de Friedreich, confinant-los a estar en cadira de rodes.

Activament s'està investigant per trobar un tractament efectiu per curar, aturar o revertir la progressió dels diferents símptomes de la malaltia. En l'actualitat d'alguns d'ells s'estan realitzant

assajos clínics en humans, mentre que altres encara es troben en fase preclínica. Els principals fàrmacs que actualment es troben en estudi es poden agrupar segons la diana de la malaltia que volen abordar, com són la millora de la funció mitocondrial i reducció de l'estrès oxidatiu, la modulació de les vies metabòliques controlades per la frataxina, substituïts, estabilitzadors o potenciadors de la proteïna frataxina, incrementar l'expressió del gen *FXN* en els pacients, i la teràpia gènica.

12.1. Millora la funció mitocondrial i reduir l'estrès oxidatiu.

En l'atàxia de Friedreich una de les conseqüències immediates de la deficiència de frataxina en les cèl·lules és l'acumulació de ferro en l'interior de la mitocòndria, que contribueix directament a l'aparició de la disfunció mitocondrial i generació d'estrès oxidatiu. És per això que s'han utilitzat diversos compostos quelants de ferro com la deferoxamina per reduir aquesta acumulació en l'interior mitocondrial i així millora la funció de la mitocòndria. Però aquest compost té una alta afinitat pel ferro, incrementant el risc de desequilibri del metabolisme del ferro cel·lular i és incapaç de creuar la barrera hematoencefàlica, impossibilitant el seu efecte a les neurones del sistema nerviós. D'altra banda, es va avaluar la deferiprona, amb menys afinitat pel ferro i capaç de creuar la barrera hematoencefàlica. En cèl·lules FRDA i assajos clínics s'ha vist que baixes concentracions de deferiprona indueixen la síntesi de frataxina, en canvi, dosis altes produeixen l'efecte contrari a més d'altres problemes com el risc d'agranulocitosi. Únicament s'ha vist efectes positius per tractar la cardiomiopatia relacionada amb la malaltia a baixes concentracions de deferiprona (295–297).

Altres aproximacions terapèutiques s'han centrat en reduir l'estrès oxidatiu, utilitzant principalment compostos amb efecte antioxidant com el coenzim Q10 o la vitamina E, utilitzats ja com a tractament en altres tipus d'atàxies (298). La idebenona és un anàleg sintètic del coenzim Q10 amb el qual assajos clínics han demostrat millores sobretot de la cardiomiopatia i en alguns casos també de la neuropatologia (299–302). En canvi, assajos clínics en fase 3 amb més pacients i més duració no han demostrat millores significatives de la malaltia (303,304). També s'ha combinat la idebenona amb altres compostos antioxidants com la riboflavina o quelants de ferro com la deferiprona (305) sense resultats evidents de millora dels símptomes neurològics i cardíacs. En l'actualitat encara hi ha controvèrsia sobre l'eficàcia de la idebenona en l'atàxia de Friedreich. Sembla que es limita a corregir lleument la hiperplàsia ventricular associada a la cardiomiopatia sense millorar significativament els símptomes neurològics (306).

L'acetil-L-carnitina (ALCAR) és un altre agent antioxidant, derivat del transportador intracel·lular d'àcids grassos L-carnitina, que s'ha investigat com a possible tractament de l'atàxia

de Friedreich. Tot i ser ben tolerat en dos assajos clínics independents, no ha demostrat ser eficient en la millora neurològica de la malaltia (NCT01921868).

La tiamina (vitamina B1) està involucrada en el metabolisme energètic, actuant de cofactor de diversos enzims de la via de la glicòlisi i el cicle de Krebs, i la comunicació neuronal. El seu dèficit s'ha demostrat que causa increment de l'estrès oxidatiu i desordres en el sistema nerviós central i perifèric (307,308), i concretament s'ha observat que els seus nivells es troben alterats en pacients amb atàxia de Friedreich (309,310). Assajos clínics en pacients han demostrat que la tiamina millora els símptomes neurològics, com la coordinació motora i la disàrtria, i també la cardiomiopatia en pacients FRDA (308,311).

El factor de transcripció Nrf2 (Nuclear factor Erythroid 2-related Factor 2 o NFE2L2) manté l'homeòstasi cel·lular redox, regulant l'expressió de gens involucrats en la protecció antioxidant com glutatió, tioredoxina, oxigenasa hemo (HO1) i NAD(P)H deshidrogenasa (NQO1), inhibeix la inflamació, millora la funció mitocondrial i bioenergètica (312–314). S'ha vist que en cèl·lules de pacients amb atàxia de Friedreich i en models animals aquest factor Nrf2 es troba reduït, per tant, una estratègia per combatre la malaltia és establir o incrementar Nrf2 per millorar la funció mitocondrial, reduir l'estrès oxidatiu, prevenint la peroxidació lipídica (199,200,315,316). El fàrmac omaveloxolona (RTA 408) actua com a activador del factor de transcripció Nrf2, permetent l'activació dels gens de resposta antioxidant, i en conseqüència protegint les cèl·lules neuronals aïllades de models animals FRDA o de fibroblasts de pacients amb FRDA de l'estrès oxidatiu (317). A més s'ha vist que incrementa la biogènesi mitocondrial, millora la funció mitocondrial i la producció energètica. Recentment, es va finalitzar un assaig clínic en fase II que va determinar la seguretat, la farmacodinàmica i l'eficàcia de l'omaveloxolona (NCT02255435). Els pacients mostraven una millora de la funció neurològica valorada amb l'escala FARS (318).

El compost PTC-743 (anteriorment EPI-743 i A0001) o també anomenada vatiquinona pertany al grup de les para-benzoquinones i actua com a diana d'enzims oxidoreductases que participen en l'estrès oxidatiu, la via inflamatòria i mort cel·lular coneguda com ferroptosi, la qual s'ha vist implicada en malalties del sistema nerviós i concretament també en l'atàxia de Friedreich. PTC-743 Incrementa la biosíntesi de glutatió, que actua d'antioxidant controlant l'estrès oxidatiu i protegint dels alts nivells de ROS (319). En un assaig clínic en fase II (NCT01728064), s'ha vist que millora significativament la funció neurològica basada en l'escala FARS, a llarg termini, i també la progressió de la malaltia en pacients amb atàxia de Friedreich (315,320).

Els àcids grassos poliinsaturats deuterats (dPUFAs) s'han utilitzat per contrarestar els efectes de l'estrès oxidatiu en la FRDA. Els àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) són el major component lipídic de les membranes, sobretot són essencials per les membranes lipídiques de les cèl·lules del sistema nerviós, i particularment per la membrana mitocondrial. La deficiència de frataxina

causa un desequilibri en el metabolisme del ferro mitocondrial, que com a conseqüència genera espècies reactives d'oxigen i ferro lliure que poden iniciar l'oxidació dels lípids de la membrana, coneguda com peroxidació lipídica, on els PUFAs són molt vulnerables, afectant l'estabilitat de la membrana i la funció mitocondrial (63). Els dPUFAs, són àcids grassos poliinsaturats sintètics, els quals s'han modificat químicament substituint les molècules d'hidrogen per deuteri, que és un isòtop d'hidrogen més estable. Els dPUFAs s'incorporen a les membranes mitocondrials, estabilitzant-les, reduint els efectes de l'estrès oxidatiu i concretament la peroxidació lipídica en cèl·lules FRDA (321). RT001 és un homòleg sintètic deuterat de l'etil linoleat, és a dir un dPUFA, que s'ha provat en assajos clínics fase I/II per l'atàxia de Friedreich (NCT02445794) amb resultats positius en el test cardiopulmonar, millora del consum d'oxigen i una tendència positiva en les escales neurològiques (322). Actualment en fase III (NCT04102501).

L'epicatequina és un flavonoide que prové de les catequines amb efectes antioxidants i s'ha demostrat que millora la funció mitocondrial en diferents models de malalties cardíques i neuromusculars. Un estudi en fase I, va demostrar que el compost millorava la funció d'enzims mitocondrials i incrementava els nivells de frataxina en plasma. S'ha realitzat un assaig clínic en fase II amb pacients amb FRDA on alguns han esdevingut casos de migranya (NCT02660112).

12.2. Modulació de les vies metabòliques controlades per la frataxina.

La leriglitazona (MIN-102) és un metabòlit de la pioglitazona, de la família de les tiazolidinediones, que actua com agonista selectiu del receptor activador de la proliferació de peroxisomes gamma (PPAR- γ) en el sistema nerviós central a unes dosis que altres glitazones no poden assolir, ja que és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica. S'ha vist que incrementa els nivells d'ARNm i proteïna frataxina i actua com antioxidant, antiinflamatori, amb efecte neuroprotector, millorant els símptomes neurològics en l'atàxia de Friedreich, la funció mitocondrial i antioxidant, la biogènesi mitocondrial i el metabolisme energètic (323,324). Ha rebut la designació de medicament orfe per al tractament de la adrenoleucodistrofia lligada al cromosoma X (X-ALD) i actualment es troba en assaig clínic fase II/III (NCT03231878). Per l'atàxia de Friedreich, es va completar un assaig clínic fase I amb èxit, i actualment s'està fent un assaig clínic fase 2 (NCT03917225). Malgrat això, s'ha discutit el seu ús, com el de les altres tiazolidinediones, pels possibles efectes secundaris que pot tenir, que principalment és la retenció d'aigua, que condueix a l'edema o inflamació i incrementa el risc de problemes cardíacs, ja que el fàrmac disminueix el número de fibres, i incrementa la biogènesi mitocondrial en el múscul cardíac (325,326). I tot això, en pacients on un percentatge elevat ja té cardiomiopatia. A més, la incidència de la fallada cardíaca incrementa quan es combinen les tiazolidinediones amb insulina, ja que s'inhibeixen la ciclooxigenasa 2, induint una resposta trombòtica (325,326). A part, s'ha

associat l'ús de pioglitazona a tenir un risc més elevat de patir càncer de bufeta respecte la població general (327,328).

El dimetil fumarat (DMF) és un compost que actua d'activador del factor de transcripció Nrf2 millorant els dèficits bioquímics i cel·lulars alterats en l'atàxia de Friedreich per la deficiència de frataxina. Potencialment pot incrementar la biogènesi mitocondrial i ha demostrat incrementar l'expressió del gen *FXN*, activant l'inici de la transcripció en models de ratolí FRDA i cèl·lules humanes de pacients amb FRDA. A més s'ha vist que redueix les estructures no canòniques *R-loop* (329,330). Actualment s'ha aprovat per el tractament de l'esclerosi múltiple i la psoriasi, on els pacients amb esclerosi múltiple han evidenciat un increment en els nivells de frataxina (330).

12.3. Substituts, estabilitzadors i potenciadors de la proteïna frataxina.

TAT-Frataxina (CTI-1601) és una proteïna frataxina sintètica que es distribueix mitjançant un fragment proteic anomenat transactivador de la transcripció (TAT), permeable per les membranes i que actua de transportador de la frataxina cap a la mitocondria. S'ha provat en models animals FRDA amb una millora de la cardiomiopatia i actualment es troba en fase I d'un assaig clínic (NCT04176991) (331,332).

S'estan estudiant compostos mimètics de l'eritropoetina (EPO) que principalment estimula la formació d'eritrocits, però també té funcions cel·lulars antiinflamatòries i antiapoptòtiques. En cèl·lules de pacients s'ha demostrat que incrementa els nivells de frataxina (333,334). Posteriorment, estudis realitzats en pacients amb compostos mimètics de l'EPO no han millorat els efectes de la patologia tot i incrementar els nivells de frataxina (335–339). Actualment, s'està estudiant nous agonistes de la eritropoetina en cèl·lules FRDA, que actuen únicament sobre els receptors d'EPO del sistema nerviós (340).

Una part de la proteïna frataxina precursora és degradada pel proteosoma després d'ubiquitinar-se durant el procés de maduració (341). S'han dissenyat molècules que modulen la ubiquitinació per impedir la degradació específicament de la proteïna frataxina i mantenir uns nivells elevats dins la cèl·lula. Els compostos competidors de la ubiquitinació actuen bloquejant els llocs d'unió de la ubiquitina a la frataxina, de manera que el proteosoma no pot degradar-la (341,342). La lligasa RING E3 (RNF126) és un enzim que interacciona específicament amb la frataxina i en promou la seva ubiquitinació i posterior degradació. La inhibició de RNF126 en cèl·lules de pacients amb FRDA, s'incrementa els nivells de frataxina (343).

En un cribratge de compostos provats en cèl·lules de pacients amb atàxia de Friedreich, l'etravirina, que s'utilitza com antiviral va demostrar augmentar els nivells de frataxina incrementant la traducció de l'ARNm de frataxina a proteïna en cèl·lules FRDA als mateixos nivells trobats en cèl·lules d'individus no portadors. A més restableix la formació dels clústers

ferro-sofre, l'activitat aconitasa i aporta resistència a estrès oxidatiu (344). Actualment se n'està desenvolupant un assaig clínic en fase 2 (NCT04273165).

12.4. Increment de l'expressió del gen *FXN*.

La insuficient expressió de la proteïna frataxina és el detonant de l'aparició patològica en l'atàxia de Friedreich. Per tant, és lògic que l'enfocament terapèutic més senzill s'hagi dirigit directament a incrementar l'expressió del gen *FXN* i els nivells d'ARNm, per obtenir conseqüentment, incrementar els nivells de la proteïna frataxina i així revertir la patologia. A més, donat que els individus portadors de la malaltia es mantenen asimptomàtics tot i expressar aproximadament la meitat del nivells de frataxina respecte els individus no portadors, indica que l'augment relativament petit de l'expressió de *FXN* en pacients amb FRDA tingui potencial terapèutic.

Inicialment, els esforços es van centrar en revertir la compactació de l'heterocromatina que es dona en l'intró 1 del gen *FXN* degut a l'expansió patològica de les repeticions GAA que és causant del silenciament gènic i la inhibició de la transcripció, enfocant-se en trobar compostos que modulin l'acetilació d'histones, la metilació d'ADN, i compostos moduladors de les estructures d'ARN. S'han avaluat diversos tipus d'inhibidors de les histones deacetilases (HDACi), que actuen mantenint les histones acetilades i així eviten la compactació de la cromatina. El grup acetil fa que es neutralitzi la càrrega positiva de les histones, i impedeix que aquestes s'uneixin fortament amb l'ADN, mantenint una estructura laxa que permet la transcripció dels gens (115,236,345–347). D'entre ells, destacar la nicotinamida (vitamina B3), que s'ha utilitzat com a d'inhibidor d'histones deacetilases (HDAC) per tal d'incrementar l'expressió de frataxina. Però els alts nivells que s'han d'administrar de nicotinamida a llarg termini per obtenir únicament un petit efecte en l'increment de frataxina, l'absència d'un efecte clínic demostrat, sumat als efectes adversos que apareixen com nàusees o vòmits i els riscos desconeguts a llarg termini, han fet que s'hagin buscat alternatives (348,349). El principal problema d'aquest abordament és la inespecificitat del tractament, ja que els HDACi no actuen específicament en el gen *FXN*, i per tant es podria alterar l'expressió d'altres gens. El BMN 290, compost successor del RG2833, és un compost semblant a la nicotinamida, però que modula selectivament la cromatina actuant com a HDACi. S'ha vist que incrementa més del doble la quantitat de frataxina i que té capacitat per penetrar al sistema nerviós central i cor (240,350,351). Malgrat això, s'ha demostrat recentment que pot generar metabòlits potencialment tòxics i se n'ha aturat el desenvolupament.

El resveratrol és un polifenol natural que té propietats antioxidants i s'ha demostrat que incrementa l'expressió de frataxina en cèl·lules FRDA *in vitro* i models de ratolí, a través de l'activació de la sirtuïna 1 deacetilasa (SIRT1), que regula l'expressió de la proteïna PGC1 α i la modulació com agonista de PPAR γ . Un assaig clínic va determinar una moderada millora dels

síntomes neurològics a altes dosis de resveratrol, sense incrementar els nivells de frataxina ni millorar la patologia cardíaca (352).

L'interferó gamma 1b (IFN- γ -1b) és una citocina involucrada en la resposta immunològica, que ha demostrat que estimula la transcripció del gen *FXN*, incrementa l'estabilitat de l'ARNm de i impedeix la neurodegeneració en cèl·lules del model de ratolí FRDA YG8R i pacients amb atàxia de Friedreich (353,354). Malgrat això, assajos clínics no han evidenciat increments significatius en l'expressió de frataxina i únicament una lleugera millora dels símptomes patològics (355–358).

Actualment, els estudis s'estan enfocant a minimitzar específicament el bloqueig de la transcripció del gen *FXN* degut a l'expansió de les repeticions GAA o minimitzar la formació de les estructures no canòniques de cadena triple d'ADN o híbrids de cadenes ADN-ARN (*R-loop*) ja sigui eliminant completament l'expansió anormal de repeticions GAA mitjançant l'edició del genoma utilitzant nucleases específiques amb dits de zinc, que ha demostrat ser eficient en cèl·lules fibroblasts de pacients, incrementant l'expressió de frataxina (239); o bé utilitzant la tècnica CRISPR-Cas9, que mostra eficiència per eliminar *in vitro* i *in vivo* l'expansió de repeticions GAA en els models transgènics humanitzats YG8R i YG8sR (292); impeding la formació de bucles R amb oligonucleòtids (ODN) específics per les repeticions GAA del gen *FXN*, que s'ha vist que incrementa els nivells de frataxina en cèl·lules de pacient (359); o incrementant la transcripció del gen *FXN* a través de factors d'elongació de la transcripció selectius per les repeticions GAA com per exemple Syn-TEF1 (360). S'ha estudiat la introducció de proteïnes efectores tipus activadores transcripcionals (TALE) mitjançant vectors virals adenoassociats per activar específicament el promotor del gen *FXN* i induir l'expressió de frataxina en ratolins YG8R. Un mes després de l'administració d'aquesta teràpia, s'ha detectat l'activació de l'expressió del gen *FXN*, amb l'increment dels nivells d'ARNm i frataxina en diferents òrgans del ratolí (361–364). Altrament, s'està investigant l'ús d'ARNs no codificants llargs antisentit naturals i sintètics (SINEUPs), que estableixen específicament l'ARNm de frataxina i optimitzen la traducció, incrementant els nivells de proteïna en un model cel·lular FRDA (365). Aquestes teràpies han resultat prometedores en cultius cel·lulars, però encara es troben en un estadi molt precoç fins poder aplicar-se com a tractament.

12.5. Teràpia gènica.

La teràpia gènica, consistent en proporcionar el gen no mutat a l'interior de les cèl·lules, és un altre enfocament per augmentar els nivells de la proteïna frataxina en els teixits afectats i així millorar la clínica de la malaltia. En els darrers anys, la teràpia gènica s'ha postulat com una estratègia terapèutica per al tractament de nombroses malalties neurodegeneratives, de les quals d'algunes ja s'estan realitzant assajos clínics (366). Per l'atàxia de Friedreich, actualment són

diversos els grups de recerca i companyies biotecnològiques que estan investigant el lliurament o transport del gen/ARNm de frataxina a l'interior de les cèl·lules afectes a través de la utilització de vectors com a vehicle, la majoria vírics, i particularment vectors virals adenoassociats (AAV), però també nanopartícules.

Els vectors AAV presenten nombrosos avantatges per al seu ús en teràpia gènica respecte altres vectors virals, és per això que s'estan utilitzant àmpliament per a tractar altres malalties hereditàries. Tenen capacitat per incloure 4,7 kb d'ADN, per tant poden allotjar fàcilment la seqüència d'ADN codificant de la proteïna frataxina, sense les seqüències intròniques, donat que és força petita (633 pb). L'administració intravenosa del vector viral adenoassociat AAVrh10 amb la seqüència de frataxina ha demostrat ser eficaç per prevenir i revertir la cardiomiopatia en un model de ratolí *knock-out* condicional de *Fxn* (MCK), que desenvolupa fallada cardíaca degut a l'eliminació completa de frataxina en el múscul cardíac i esquelètic. L'administració postsimptomàtica del vector AAVrh10 reverteix la cardiomiopatia a nivell funcional, cel·lular i molecular dels ratolins MCK, recuperant la disfunció energètica i la desorganització estructural dels cardiomiòcits (367). Un estudi posterior va demostrar que el rescat complet de la cardiomiopatia es produeix amb només la meitat de cardiomiòcits transduïts pel vector AAVrh10-FXN (368). La teràpia gènica per tractar l'atàxia de Friedreich utilitzant el vector viral AAV9 amb la seqüència codificant de frataxina (AAV9-FXN) administrat intraperitonealment proveeix expressió de frataxina en el cor, cervell, músculs, ronyó i fetge de dos models de ratolí *knock-out* condicionals, MCK i NSE. En ambdós models es va incrementar aproximadament el doble el temps de vida dels ratolins, i concretament en el model MCK, que mostra la cardiomiopatia, es va observar una millora de la funció sistòlica (369). Posteriorment, s'ha demostrat que l'administració intravenosa del vector AAV9 amb la seqüència d'ADN codificant de la frataxina prevé l'aparició dels dèficits motors i sensitius i evita la progressió de la neurodegeneració d'un nou model de ratolí *knock-out* condicional (Pvalb *Fxn-cKO*), que es caracteritza per la supressió completa de frataxina en cèl·lules que expressen parvalbúmina, que principalment són neurones del sistema nerviós, manifestant atàxia sensorial i neuropatia de manera precoç i molt severa, amb mort prematura (283). En el mateix model de ratolí, l'administració post-simptomàtica del vector AAV9 per via intravenosa complementada amb una injecció intracerebral del vector AAVrh10, ambdós amb capacitat d'expressar frataxina i regulada a través del promotor sintètic derivat de virus CAG, transdueix eficientment neurones dels DRG i la medul·la espinal, principalment afectades en l'atàxia de Friedreich, entre altres; aconseguint rescatar la neuropatia sensitiva i allargar la vida dels animals (283). Una administració única intravenosa del vector AAV9 amb la frataxina és incapaç de revertir els símptomes neurològics en el model de ratolí, donat que la capacitat de transducció en el cerebel i la medul·la espinal són baixos, i requereix de

l'administració intracerebral directament en el sistema nerviós central per poder transduir les neurones afectades i revertir el fenotip neuropatològic (283).

Altres esforços cap a la teràpia gènica per l'atàxia de Friedreich inclouen l'ús d'altres vectors virals com els basats en el Virus Herpes Simple (HSV). Particularment, aquest virus és neurotròfic i té més capacitat per incorporar fragments més grans d'ADN. S'ha provat la seva eficàcia per transferir el gen *FXN* complet en cultius cel·lulars i l'eficiència de la duració de l'expressió del transgèn en el cerebel i DRG de ratolins (161,370,371). Un altre estudi va incloure 5 kb de la regió promotora del gen *FXN*, i la seqüència d'ADN codificant de la frataxina, incloent l'intró 1, amb l'objectiu de regular l'expressió de proteïna frataxina recombinant de la mateixa manera que es regula endògenament en les cèl·lules, i també perquè permet obtenir l'expressió del transcrit 4, que dona lloc a la isoforma II de frataxina, específica majoritàriament del sistema nerviós. El vector HSV va demostrar ser eficient per transduir cultius de neurones de DRG de fetus de rata, incrementant substancialment els nivells d'ARNm i proteïna frataxina. La seva administració en la planta de les potes inferiors de rates, va demostrar ser eficient per expressar frataxina en els DRG fins 1 mes després de l'administració, mitjançant el transport neuronal retrògrad del virus (372). L'administració directa en el tronc cerebral de HSV en un ratolí KO condicional va demostrar millorar la coordinació motora dels ratolins (373). Malgrat això, els estudis amb vectors HSV per teràpia gènica no estan tan avançats com els basats en AAV, per ser aprovats com a tractament, degut als possibles problemes de seguretat pels pacients i per la resposta immunitària que poden desencadenar.

La teràpia gènica utilitzant lentivirus com a vector per a l'atàxia de Friedreich s'ha provat en fibroblasts de pacients i models de ratolí FRDA, incrementant els nivells d'expressió de frataxina, reduint la sensibilitat a estrès oxidatiu i el dany en l'ADN (232,374). Inconvenientment, els lentivirus poden desenvolupar resposta immunitària, s'integren aleatòriament en el genoma de la cèl·lula hoste podent generar mutacions per recombinació, necessiten de més estudis de seguretat, i per tant és més complicat que arribin a utilitzar-se com a tractament almenys a curt termini.

Un segon enfocament de la teràpia gènica és el lliurament d'ARNm de *FXN* directament als teixits afectats utilitzant nanopartícules com a vectors, enlloc de virus. L'administració intravenosa d'ARNm de *FXN* encapsulada en nanopartícules lipídiques (LNP) va mostrar un increment dels nivells de frataxina i una correcta maduració de la proteïna en el fetge de ratolins adults 7 dies després de l'administració; i s'ha detectat expressió de frataxina recombinant en neurones dels DRG dels ratolins després de l'administració intratecal en la medul·la espinal de les LNP amb l'ARNm de frataxina (375). Tot i això, no s'ha descrit la reversió dels signes neurològics o la cardiomiopatia en cap model de ratolí FRDA.

Tot i els avenços preclínic de la teràpia gènica, encara queden reptes que en requereixen una millora per assegurar la seva eficàcia i seguretat abans d'iniciar-se assajos clínics (376). L'ús de vectors no integratius en el genoma per evitar mutagènesi, un sistema d'administració per dirigir eficaçment la teràpia a les cèl·lules afectades, la immunogenicitat dels vectors, els nivells que proveeixen d'expressió de frataxina, entre altres, en són alguns exemples.

12.6. Teràpia cel·lular.

La teràpia cel·lular per l'atàxia de Friedreich s'ha caracteritzat principalment per l'ús de cèl·lules mare de medul·la òssia per a protegir i reparar les neurones. El tractament amb cèl·lules mare mesenquimals provinents tant de ratolins WT incrementa l'expressió de frataxina, millora la funció motora i disminueix la neurodegeneració dels ratolins FRDA (377,378). L'ús de factors com citocines i factors de creixement provinents d'aquestes cèl·lules mare, van mostrar un increment d'expressió de frataxina i la millora de la defensa antioxidant en cèl·lules de pacients i línies neuronals deficientes en frataxina (379–381). La teràpia amb citocines com a factors estimulants de granulòcits (G-CSF) i de cèl·lules mare (SCF) va demostrar incrementar els nivells de frataxina, tenir efectes neuroprotectors, i millorar la coordinació motora en ratolins humanitzats FRDA (288). En un altre estudi es van trasplantar cèl·lules mare de la medul·la òssia amb capacitat per expressar la frataxina WT en ratolins humanitzats FRDA. Aquesta teràpia cel·lular es va complementar amb l'administració mensual de factors de cèl·lules mare G-CSF i SCF per a millorar la integració de les cèl·lules mare en els ratolins. Els resultats van mostrar la integració de les cèl·lules mare en teixits del sistema nerviós, maduració i fusió de les cèl·lules mare a neurones, es va detectar increment en els nivells de frataxina i les defenses antioxidants, la millora de la coordinació motora i activitat locomotora (382). No obstant, no s'han iniciat assajos clínics per determinar-ne l'eficàcia en pacients.

13. Teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats.

La teràpia gènica consisteix en introduir material genètic funcional a l'interior de cèl·lules, per tal de reparar, regular, reemplaçar, afegir o suprimir una seqüència genètica defectiva i així tractar o prevenir una malaltia (383,384). Aquest material genètic pot ser qualsevol seqüència d'àcids nucleics que tingui una funcionalitat terapèutica, tot i que normalment són gens sencers, gens simplificats, a través d'introduir únicament les seqüències d'ADN codificants, o ARNm. En funció de les característiques de la malaltia a tractar, s'utilitza una estratègia de teràpia gènica determinada, la més comú, utilitzada en la majoria de malalties monogèniques, es centra en proporcionar la còpia corregida del gen mutat amb la finalitat de recuperar la seva funció i de revertir el fenotip patològic observat als pacients afectats. Altres estratègies es centren en

subministrar ARNi per interferir l'ARNm i disminuir específicament l'expressió del gen, sobretot utilitzada per trastorns deguts a la toxicitat per la formació d'agregats de proteïna. Un altres tipus d'estratègia es basa simplement en proporcionar material genètic per sintetitzar productes que millorin els fenotips de malalties com factors de creixement (385), proteïnes de la via de senyalització del calci (386), anticossos per a malalties infeccioses (387), etc. Recentment, s'estan explorant tecnologies que permeten noves estratègies de teràpia gènica, a través de l'edició gènica amb nucleases de dits de zinc, nucleases efectores activadores de la transcripció i la tecnologia CRISPR-Cas9.

Existeixen dos tipus de teràpia gènica, *ex vivo* i *in vivo*, que es diferencien en la manera d'introduir el material genètic funcional en les cèl·lules. En la teràpia gènica *ex vivo*, la transfecció cel·lular té lloc en l'exterior del pacient, i es realitza a partir d'una biòpsia de teixit del pacient en cultiu *in vitro*, després de la transfecció, les cèl·lules ja modificades genèticament es trasplanten en el pacient. Aquests tipus de teràpia gènica és interessant per abordar malalties que afecten a un sol tipus cel·lular o un teixit específic i localitzat, però estan limitades a aquelles cèl·lules que poden cultivar-se i mantenir-se en cultiu *in vitro*. La teràpia gènica *in vivo*, consisteix en lliurar el material genètic directament en els òrgans i teixits diana, de manera que la transfecció cel·lular té lloc en l'interior del pacient. El principal repte que presenta aquesta tècnica és l'especificitat de transfectar i lliurar el material genètic únicament les cèl·lules diana afectes dels pacients (383).

Generalment, s'utilitzen vectors com a vehicle per transportar i introduir les seqüències d'àcids nucleics en l'interior de cèl·lules. Els virus, per la seva capacitat natural per infectar cèl·lules, alliberant el material genètic en el seu interior com a part del seu cicle de replicació, són els vectors més utilitzats en teràpia gènica. De l'ampli ventall de virus existents, la majoria dels que s'han utilitzat per estudis a nivell preclínic i clínic són els retrovirus, lentivirus, herpes virus, adenovirus, i virus adenoassociats (AAV) (388). Els retrovirus i els lentivirus s'han utilitzat principalment per a realitzar teràpies gèniques *ex vivo*, mentre que els adenovirus i els virus adenoassociats són els més utilitzats per teràpies *in vivo* (389,390).

En els darrers anys, la teràpia gènica s'ha erigit com una solució viable per al tractament de diferents tipus de malalties cardiovasculars, musculars, metabòliques, hematològiques, oftalmològiques, neurològiques, infeccioses i canceroses (388–390). L'any 2003, la Xina va aprovar el primer producte de teràpia gènica per a ús clínic, Gendicine, basat en un vector adenoviral amb l'ADNc per sintetitzar la proteïna p53, amb aplicació antitumoral contra el carcinoma de cèl·lules escamoses (391,392). A Europa, la primera teràpia gènica es va aprovar l'any 2012, Glybera, basada en l'ús de vectors AAV per a tractar pacients amb deficiència de la lipoproteïna lipasa (393,394). El 2016, Strimvelis, el segon tractament de teràpia gènica mitjançant retrovirus es va aprovar a Europa, per tractar la immunodeficiència combinada severa per dèficit de l'adenosina desaminasa (ADA-SCID) (395). El 2017, l'administració d'Aliments i

Medicaments dels Estats Units (FDA) va aprovar Kymriah (Tisagenlecleucel), basat en un vector lentiviral, i Yescarta (Axicabtagen ciloleucel) basat en un vector retroviral, per al tractament de la leucèmia limfoblàstica aguda i del limfoma de cèl·lules B grans, respectivament (389,396). A finals del 2017, Luxturna (Voretigene neparvovec) es va convertir en la primera teràpia gènica *in vivo* aprovada. Aquesta teràpia basada en vectors AAV2, tracta pacients amb amaurosis congènita de Leber associada al gen RPE65 que manifesten ceguera hereditària, mitjançant una administració subretiniana (389,397). Al 2019, el fàrmac de teràpia gènica Zolgensma (onasemnogene abeparvovec), basat en el vector AAV9 va ser aprovat per la FDA per tractar l'atròfia muscular espinal (SMA), un desordre neuromuscular infantil, proporcionant el gen SMN1 a través de l'administració intravenosa del vector AAV9 (398,399).

A banda dels tractaments de teràpia gènica ja aprovats, en l'actualitat són moltes les malalties que s'estan abordant amb teràpia gènica en assajos clínics, i el número s'incrementa encara més en fases preclíniques. Concretament fins la data s'han realitzat un total de 3001 estudis amb teràpia gènica en assajos clínics, dels quals 350 són per malalties monogèniques i 53 són per al tractament de malalties neurològiques, dels quals 20 s'estan realitzant amb AAV (366). Per l'atàxia de Friedreich, malauradament a dia d'avui encara no se n'ha iniciat cap assaig clínic.

13.1. Els vectors virals adenoassociats.

Els vectors virals adenoassociats (AAV, per l'abreviació en anglès) són el tipus de virus més utilitzat en els darrers anys per al tractament de malalties neurodegeneratives, amb característiques similars a l'atàxia de Friedreich, perquè presenten nombrosos avantatges respecte els altres vectors virals com la seva àmplia capacitat de transducció *in vivo* de diferents tipus cel·lulars, especialment cèl·lules quiescents com les neurones, no són patogènics, és a dir, no causen cap malaltia en humans, i presenten baixa immunogenicitat, per tant són segurs; rarament s'integren en el genoma de la cèl·lula hoste, de manera que no poden generar mutagènesi, i han demostrat proveir una expressió de llarga durada (400–404).

13.1.1. Estructura i biologia dels virus adenoassociats.

Els virus adenoassociats (AAV) pertanyen al gènere *Dependovirus*, de la família *parvoviridae* (405). El seu cicle de replicació depèn de la presència d'un virus auxiliar *helper*, que normalment és un adenovirus, per això s'anomenen adenoassociats (406). Els AAV s'han trobat en múltiples espècies de vertebrats, incloent humans i primats no humans, però no causen cap malaltia humana. Estan compostos d'una càpsida icosaèdrica de naturalesa proteica d'aproximadament 20-26 nm de diàmetre i un genoma d'ADN monocatenari de 4,7 kb amb dos gens codificants, *cap*, que codifica les tres proteïnes de la càpsida (VP1, VP2, VP3); i *rep*, que codifica 4 proteïnes necessàries per a la replicació viral (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40) (407–410). El genoma està

flanquejat per dos repeticions terminals invertides (ITR) d'uns 145 pb cadascuna, que formen unes estructures en forquilla, que serveixen d'origen de replicació viral i de senyal d'empaquetament, i per tant, són essencials per la replicació del genoma viral, la integració i la formació de la càpsida (411–415). Addicionalment, la proteïna activadora de muntatge (AAP), que es codifica a partir d'un marc de lectura diferent del gen *cap*, ha demostrat ser essencial per l'empaquetament de la càpsida i formació del viriò (413,416,417) (**Figura 6A i 6B**).

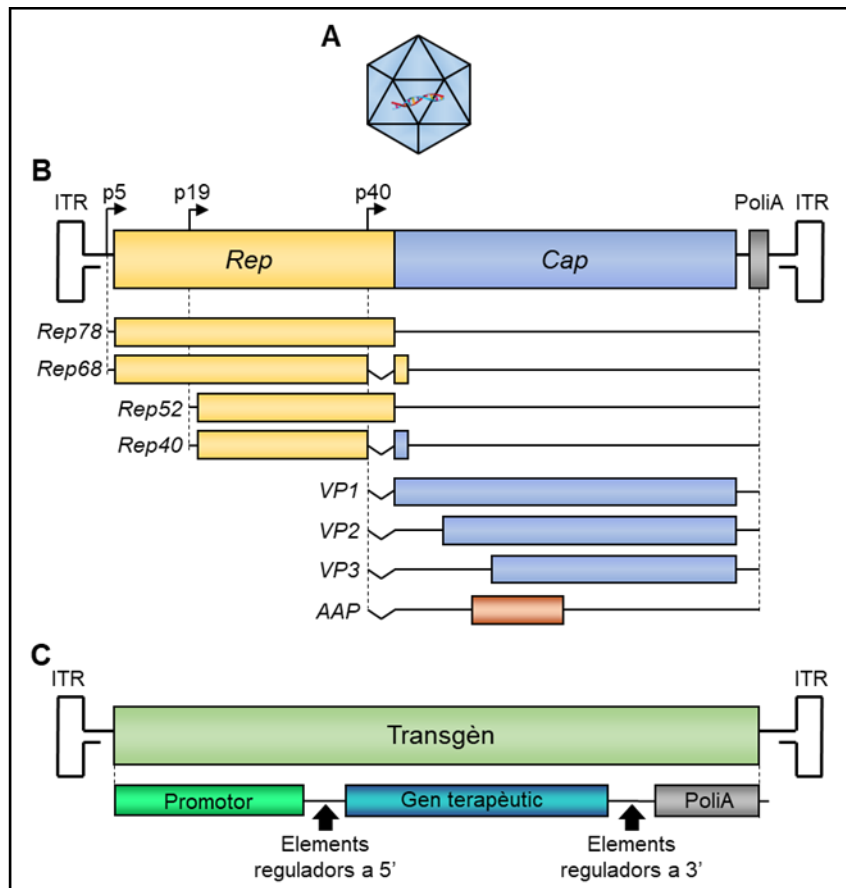


Figura 6. Representació esquemàtica dels virus adenoassociats (AAV). **A)** Representació esquemàtica de l'estructura de la càpsida del AAV. **B)** Representació esquemàtica de l'estructura del genoma del virus adenoassociat. El genoma d'ADN monocatenari del AAV està flanquejat per 2 repeticions terminals invertides (ITR) i conté els gens *rep*, *cap* i *aap*. Les tres fletxes indiquen la posició de tres promotors a les posicions 5, 19, 40. El gen *rep* codifica per 4 proteïnes no estructurals necessàries per la replicació Rep78, Rep68, Rep 52 i Rep40. El gen *cap* codifica les 3 proteïnes estructurals amb les que es forma la càpsida VP1, VP2 i VP3 regulades pel promotor p40. La proteïna AAP s'expressa a partir d'un lloc d'inici de traducció no convencional dins del gen *cap*. Totes les variants AAV tenen la mateixa poliA. **C)** Representació esquemàtica del genoma d'un vector viral adenoassociat recombinant. Els gens propis del AAV es substitueixen pel transgen, a excepció de les ITR. Els elements essencials que ha d'incloure per expressar la proteïna terapèutica són el promotor, el gen terapèutic i la seqüència de poliadenilació. Addicionalment es poden afegir altres elements reguladors sempre que no s'excedeixi la mida màxima de 4,7 kb d'ADN que es poden encapsidar.

Els virus adenoassociats infecten les cèl·lules a través de la unió específica de regions de les proteïnes de la càpsida a receptors primaris i coreceptors de la superfície cel·lular, desencadenant la seva endocitosis a través d'endosomes recoberts de clatrina (404,418,419). Després que un canvi estructural, degut al pH àcid dels endosomes, exposi la regió N-terminal de les proteïnes de la càpsida VP1 i VP2, i múltiples senyals de tràfic nuclear, els virions AAV surten dels endosomes i s'acumulen a la regió perinuclear de les cèl·lules (404,419–425). Un cop al nucli, els virions AAV obren la càpsida i alliberen el seu genoma monocatenari, que es converteix en ADN de doble cadena, utilitzant els complexos ADN polimerasa de la cèl·lula hoste (**Figura 7**). El genoma AAV pot integrar-se en el genoma de les cèl·lules humanes, concretament en un lloc únic del cromosoma 19 (banda 19q13), conegut com AAVS1, per establir la latència (426–430). Això és degut en part a la similitud de seqüència entre la regió cromosòmica AAVS1 i les ITR del virus, combinat amb l'activitat de les proteïnes Rep (428,431).

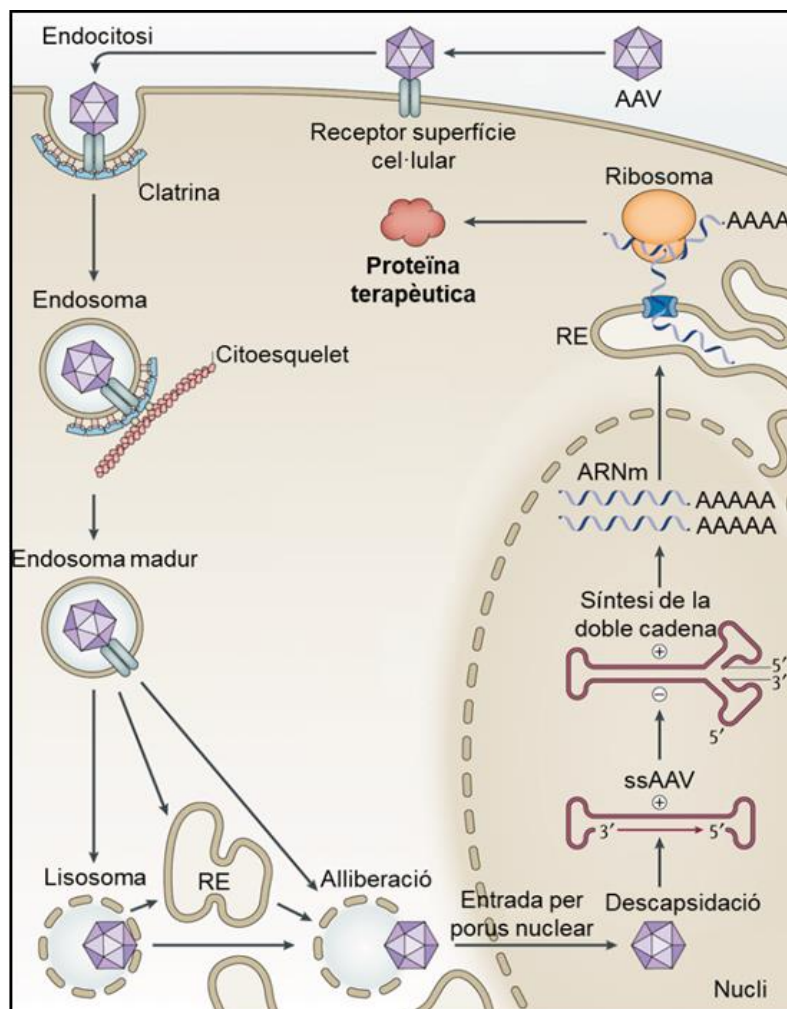


Figura 7. Via de transducció del vector viral AAV. RE, reticle endoplasmàtic; ssAAV, AAV d'una cadena. Figura adaptada de (383).

13.1.2. Característiques dels vectors recombinants AAV.

Els vectors recombinants AAV (rAAV) que s'utilitzen com a vectors per a teràpia gènica no contenen cap seqüència codificant del genoma viral, s'han modificat per desproveir dels gens *cap* i *rep*, exceptuant les repeticions ITR. Aquestes seqüències codificants *cap* i *rep* són expressades en un plasmidi separat durant la síntesi dels virions recombinants AAV, anomenat plasmidi AAV d'empaquetament, juntament amb un plasmidi que conté els gens necessaris de l'adenovirus (432). Per tant, s'elimina el 96% del genoma viral, mantenint únicament les repeticions ITR, que són essencials durant la transducció cel·lular per poder guiar la replicació i assegurar l'expressió del transgèn, a part de participar en el procés d'encapsidació del genoma durant la producció de virions (411,433). L'eliminació completa de les seqüències de codificació viral, permet en el seu lloc, introduir un transgèn entre les repeticions terminals invertides (ITR), que normalment està compost per la seqüència codificant del gen terapèutic regulat per un promotor, i una seqüència de poliadenilació, entre altres elements reguladors que es poden incloure (**Figura 6C**). D'aquesta manera, es maximitza la capacitat d'empaquetament d'ADN recombinant en els rAAV, principal desavantatge d'aquest tipus de vectors per al seu ús en teràpia gènica, ja que està limitat a 4,7 kb, i per tant no permet incloure gens de mida gran (434–438). Els rAAV perden la capacitat per integrar-se en el genoma de la cèl·lula hoste, ja que les proteïnes virals Rep78 i Rep68, suprimides en el genoma dels AAV recombinants, són requerides per a la integració (439). El genoma víric recombinant monocatenari, un cop a l'interior del nucli, es converteix a ADN de doble cadena, utilitzant els complexos d'ADN polimerasa de les cèl·lules hoste (440), i fusiona els seus extrems a través de les ITR, adoptant una estructura circular, podent formar estructures concatèmers i mantenint-se en forma d'episoma, en el nucli de la cèl·lula infectada (404,441–443). L'episoma actua de cromosoma autònom conferint estabilitat al transgèn recombinant, afavorint una expressió gènica a llarg termini i evitant la mutagènesi del genoma de la cèl·lula hoste. A partir de l'estabilització del genoma viral en forma d'episoma, es pot iniciar la transcripció del transgèn i posterior traducció i síntesi de la proteïna terapèutica (383) (**Figura 7**).

Les característiques proteïques de la càpsida dels AAV defineixen el seu tropisme, caracteritzat pel tipus de cèl·lula que és capaç de transduir. A més, determinen l'eficàcia en el procés de transducció, tràfic intracel·lular i la resposta immunològica. Durant la transducció, els tipus de receptors cel·lulars que reconeixen i interaccionen amb la superfície de la càpsida dels AAV defineixen el serotip de l'AAV. Fins l'actualitat s'han identificat 12 serotips naturals, en humans i primats no humans, encara que existeixen més de 100 variants descrites d'aquests serotips (404,444). Cadascun d'aquests serotips conté variacions en la seqüència aminoacídica de les proteïnes que formen la càpsida, suficientment diferents com per no poder ser neutralitzats pels mateixos anticossos, per tant reconeixen diferents tipus de receptors cel·lulars i, en conseqüència tenen tropisme per infectar amb major o menor eficiència un tipus cel·lular concret (445).

Com a receptors cel·lulars primaris, les càpsides AAV s'uneixen a una gran varietat de proteoglicans com l'heparan sulfat en els AAV2 i AAV3; l'àcid siàlic (SIA) en els AAV1 i AAV4, AAV5; heparina i SIA per l'AAV6; i galactosa per l'AAV9 (446–451). Com a receptors secundaris s'han identificat per diferents serotips, el receptor del factor de creixement de fibroblast (FGFR) (452), la integrina $\alpha\beta 5$ en l'AAV2 (453); el receptor del factor de creixement d'hepatòcit en l'AAV3 (454); el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR) en l'AAV5 (455); i el receptor de laminina en l'AAV2, AAV3, AAV8 i AAV9 (447,456). Recentment, s'ha trobat un receptor d'AAV (AAVR) com un cofactor necessari per a la transducció d'alguns serotips AAV (457). Cada tipus cel·lular té diferents receptors en la superfície cel·lular, de manera que les interaccions amb cadascun dels diferents serotips AAV, determinarà la biodistribució i el tropisme per cada tipus de cèl·lula, amb una especificitat i eficiència variable de transducció (445,458) (**Taula 5**). A més la càpsida té un paper determinant en l'eficiència d'expressió del transgèn, ja que intervé en el tràfic intracel·lular del viriò, des de la membrana cel·lular fins al nucli, i en la descapsidació per alliberar el genoma viral en l'interior del nucli (459).

Serotip AAV	Origen d'on es va aïllar	Receptor primari	Co-receptor	Tropisme	Malalties en que s'ha utilitzat (Identificador d'assaig clínic)	Aprovat com a fàrmac
AAV1	Primat	Àcid siàlic	AAVR	Múscul, SNC, cor	Malalties musculars (NCT01519349) Fallada cardíaca (NCT01643330) Deficiència d'AAT (NCT01054339, NCT00430768)	-
AAV2	Humà	Heparan sulfat	Integrina, FGFR, HGFR, LamR, AAVR	Fetge, SNC, múscul	Malalties oculars (NCT00643747) Hemofília (NCT00515710) Malalties neurològiques (NCT00400634) Deficiència AAT (NCT00377416)	Luxturna (Amaurosis congenita de Leber)
AAV3	Primat	Heparan sulfat	FGFR, HGFR, LamR, AAVR	Múscul, cèl·lules mare	No es realitza cap assaig clínic	-
AAV4	Primat	Àcid siàlic	Desconegut	Ull, SNC	Malalties oculars (NCT01496040)	-
AAV5	Humà	Àcid siàlic	PDGFR, AAVR	SNC, pulmó, ull	Hemofília (NCT03520712) Malalties oculars (NCT02781480) Porfíria aguda intermitent (NCT02082860)	-
AAV6	Humà	Heparan sulfat i àcid siàlic	EGFR, AAVR	Múscul, SNC, cor, pulmó	Hemofília (NCT03061201) Malalties neurològiques (NCT02702115)	-
AAV7	Primat	Desconegut	Desconegut	Múscul, SNC	No es realitza cap assaig clínic	-
AAV8	Primat	Desconegut	LamR, AAVR	Fetge, múscul, pàncreas, SNC	Malalties oculars (NCT03066258) Hemofília (NCT00979238) Malalties musculars (NCT03199469)	-
AAV9	Humà	Galactosa	LamR, AAVR	Tots els teixits	Malalties neurològiques (NCT02122952) Malalties musculars (NCT03362502)	Zolgensma (Atròfia muscular espinal)
AAV10	Primat	Desconegut	Desconegut	Múscul	-	-
AAV11	Primat	Desconegut	Desconegut	Desconegut	-	-
AAV12	Humà	Desconegut	Desconegut	Nasal	-	-

Taula 5. Propietats i ús clínic dels serotips AAV. AAT, α 1-antitripsina; AAV, virus adenoassociat; AAVR, receptor AAV; SNC, sistema nerviós central; EGFR, receptor del factor de creixement epidèrmic; FGFR, receptor del factor de creixement fibroblàstic; HGFR, receptor del factor de creixement d'hepatòcits; LamR, receptor laminina; PDGFR, receptor del factor de creixement derivat de plaquetes. Taula adaptada de (383).

Els serotips més àmpliament utilitzats per estudis de teràpia gènica en el sistema nerviós central són l'AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 i AAVrh10 (460–463). Tot i que cadascun d'ells té un tropisme i unes característiques infectives diferents. Els primers estudis van utilitzar sobretot l'AAV2, però la propagació i transducció en el cervell és bastant limitada en comparació amb serotips caracteritzats més recentment. Posteriorment van ser l'AAV1 i l'AAV5, que van demostrar ser més eficients per transduir neurones i glia en cervell de rata i primats (460,464). En els darrers anys domina l'ús de l'AAV8, l'AAV9 i l'AAVrh10, destacant sobretot l'AAV9, en assajos clínics per malalties amb afectació en el sistema nerviós (465).

El serotip AAV9 té una alta eficiència de transducció *in vivo* per molts tipus cel·lulars diferents, però particularment per neurones i astròcits, amb una ampla distribució en el cervell, la medul·la espinal i els DRG (445,465–469). Juntament amb l'AAVrh10, l'AAV9 ha demostrat tenir l'eficiència més elevada entre tots els serotips AAV descrits per transduir neurones, però addicionalment a diferència del AAVrh10, té capacitat per transduir astròcits (468,470–472). Quan es comparen administracions directament en el SNC, l'AAV9 ha demostrat ser el serotip amb més propagació, distribució i expressió (466,473). Únicament, l'AAV1, AAV5 i AAV8 han demostrat una distribució similar, però menor expressió. Això és degut a la seva habilitat en el transport extracel·lular, i sobretot intracel·lular en les neurones caracteritzat per un transport axonal en ambdós direccions, retrògrada i anterògrada, permetent la transducció entre cèl·lules que no són diana pel serotip, ja que no contenen els receptors per ser transduïdes (462,465,466,474–477).

Importantment, un dels reptes en teràpia gènica dirigida al SNC és creuar la barrera hematoencefàlica. Aquesta barrera és un sistema de protecció del sistema nerviós central, que té una permeabilitat selectiva limitant el pas de substàncies exògenes provinents del corrent sanguini. Al contrari que d'altres serotips, l'AAV9 és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica mitjançant una administració perifèrica, permeten poder realitzar un tractament per al SNC mínimament invasiu (469,471,478). A part de l'AAV9, l'AAV8 i AAVrh10 també han demostrat ser capaços de creuar la barrera hematoencefàlica, tot i que de manera menys eficient (474,479). L'AAV9 ha mostrat eficiència per creuar la barrera hematoencefàlica a través d'una administració intravenosa en ratolí, rata, gat, primats i humans (472,478,479). En ratolins, l'administració intravenosa amb AAV9 ha demostrat ser exitosa per al tractament de desordres en el SNC com

l'atròfia muscular espinal (SMA) i MPSIIIB, entre altres (480,481). Molt importantment, aquest serotip té aplicabilitat translacional, ja que quan es compara entre espècies, l'AAV9 ha demostrat que manté el tropisme i distribució (472,478,482). També s'ha vist que l'AAV9 administrat directament en el SNC pot transduir teixits sistèmics (473), de manera que malalties neurodegeneratives amb afectació multisistèmica en també òrgans perifèrics fora de sistema nerviós poden ser tractades amb aquesta estratègia. Tot aquest conjunt de característiques ha fet que l'AAV9 sigui dels serotips més utilitzats en teràpia gènica, i actualment amb el que s'estan realitzant més assajos clínics per al tractament de malalties neurodegeneratives.

La durada de l'expressió transgènica a través d'AAV recombinants és essencialment permanent en les cèl·lules que no es divideixen després d'una sola dosi. S'ha vist que l'expressió del transgèn lliurat amb rAAV té una duració de més de 6 mesos en cervell de ratolí (483), almenys 8 anys en gossos (484), i pot persistir en altres teixits fins almenys 6 anys en primats (485,486). En assajos clínics en humans s'ha mostrat que els efectes terapèutics deguts a l'expressió del transgèn per la teràpia gènica amb AAV persisteixen fins almenys 10 anys en el cervell i altres teixits (487,488).

13.2. Vies d'administració.

La via d'administració dels vectors virals escollida és essencial per un tractament de teràpia gènica eficient, ja que ha de permetre als vectors virals recombinants contactar amb les cèl·lules diana afectades per obtenir una òptima i localitzada eficiència de transducció. Per tal d'escollir la via d'administració adequada, és important conèixer la fisiopatologia de la malaltia, les cèl·lules diana afectades, el vector viral adequat, valorar el risc-benefici, la seguretat i els factors que poden interferir en la interacció del vector viral amb la cèl·lula diana.

Per al tractament de teràpia gènica de malalties neurodegeneratives és molt important afrontar el creuament de la barrera hematoencefàlica, definida com una barrera física i bioquímica que regula de manera molt precisa i selectiva el pas de substàncies endògenes i exògenes al sistema nerviós central (489). D'aquesta manera, la barrera hematoencefàlica protegeix al SNC en general de molècules grans i hidrofòbiques, així com la majoria de virus, fàrmacs i determinades proteïnes. Actualment, s'han utilitzat diverses vies d'administració, amb capacitat per creuar la barrera hematoencefàlica mecànicament o biològicament, i transduir neurones del sistema nerviós per al tractament de malalties neurodegeneratives amb resultats exitosos com la via sistèmica, o administracions directament en el sistema nerviós central com la via intratecal, intracisterna magna, intracerebroventricular o intraparenquimal.

13.2.1. Administració sistèmica.

L'administració intravascular o sistèmica és la ruta més comú en teràpia gènica i ha demostrat ser indicada per al tractament de malalties multisistèmiques incloent les que tenen afectació en el SNC. Es realitza a través de la injecció de les partícules virals a la sang, que com a fluid en contacte amb la majoria d'òrgans i teixits, permet una ampla distribució multisistèmica. Si es necessita una transducció específica i localitzada no seria la ruta recomanada. El principal avantatge juntament amb la distribució, és que la injecció no és invasiva, de manera que no suposa cap risc físic pel pacient o animal. Inconvenientment, aquesta ampla biodistribució, depenent del tropisme del vector viral, pot provocar la transducció inespecífica de cèl·lules que no es troben afectes, podent causar toxicitat. Un altre dels inconvenients de l'administració intravenosa és que els vectors virals poden interaccionar amb proteïnes del sèrum de la sang o anticossos que els neutralitzin (NAbs), impedit la unió de la càpsida amb els receptors cel·lulars de les cèl·lules diana, baixant l'eficiència i especificitat transducció, i contribuint també a la generació d'una resposta immunològica i inflamatòria.

Per al tractament de trastorns en el SNC, l'ús d'aquest tipus d'administració pot no ser indicat si no s'utilitza un vector viral adequat, degut a la presència de la barrera hematoencefàlica. Aquesta barrera, com prèviament s'ha comentat, aïlla i protegeix el sistema nerviós central del corrent sanguini, restringint el pas a la majoria de vectors virals, inclús molts AAV per creuar-la, a excepció principalment dels serotips AAV8, AAV9 i AAVrh10, destacant l'AAV9 que és el més hàbil per fer-ho (472,478). S'ha proposat que el mecanisme molecular que utilitzen els AAV per travessar la barrera hematoencefàlica podria ser per transcitosi en les cèl·lules endotelials que conformen la barrera (479,490). De fet, un estudi recent ha descrit que el AAV9 travessa la barrera hematoencefàlica a través de mecanismes de transport actiu intracel·lular sense comprometre la integritat de la barrera (491,492). Tot i això, l'eficiència per creuar la barrera hematoencefàlica és baixa, de manera que són poques les partícules virals respecte el total administrades capaces de creuar-la i transduir les cèl·lules diana, limitant la distribució i nivells d'expressió del transgèn i en definitiva la capacitat terapèutica en el sistema nerviós central. Com a solució s'utilitzen dosis elevades, per incrementar el número de partícules que creuen la barrera hematoencefàlica, a expenses d'exposar més partícules virals al sistema immunològic, podent generar una elevada resposta immunitària i inflamatòria. Malgrat totes les limitacions per al tractament de malalties neurològiques, l'administració sistèmica amb l'AAV9 ha estat aprovada per al tractament de l'atròfia muscular espinal (SMA) (399,480), i actualment s'està utilitzant en assajos clínics en pacients per al tractament de malalties neurodegeneratives com MPSIIIB (NCT03315182), MPSIIIA (NCT04088734), la gangliosidosi tipus 1 (NCT03952637), entre altres. Per al tractament de l'atàxia de Friedreich l'administració intravenosa d'AAVrh10 ha revertit la

cardiomiopatia en un model de ratolí *knock-out* condicional; i l'AAV9 parcialment el fenotip neurològic en estudis preclínic amb models de ratolí *knock-out* condicionals.

13.2.2. Administració directa al sistema nerviós.

L'administració directa en el SNC permet dirigir la teràpia exclusivament a les cèl·lules diana afectades, i és una alternativa per reduir la resposta immunològica, ja que en general requereix dosis més baixes per arribar a l'expressió del transgèn amb rellevància clínica en els teixits del SNC. Les estratègies més utilitzades per al subministrament d'AAV són les injeccions directes en el líquid cefalorraquidi (LCR) com l'administració intratecal (IT), intracisterna magna (ICM) o intracerebroventricular (ICV), o bé directament a través del parènquima cerebral anomenada intraparenquima. El líquid cefalorraquidi es sintetitza en els plexes coroidals dels ventricles del cervell, des d'on es distribueix cap al canal central de la medul·la espinal i l'espai subaracnoïdal a través del Foramen de Magendie en la cisterna Magna. Un cop a l'espai subaracnoïdal, el LCR es distribueix àmpliament circulant per tot el SNC.

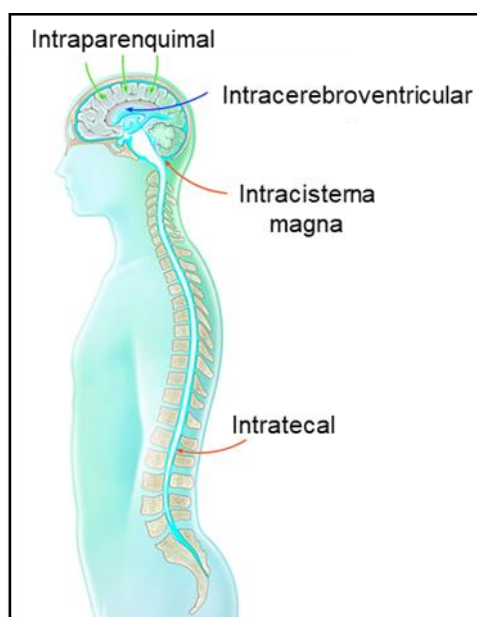


Figura 8. Vies d'administració dirigides al sistema nerviós central per injecció directa en el parènquima o en el líquid cefalorraquidi. Figura adaptada de (493).

L'administració intratecal és realitzada mitjançant una injecció en la zona lumbar de la medul·la espinal amb l'objectiu de lliurar els vectors virals en l'espai intratecal o cavitat subaracnoïdal, directament en el líquid cefalorraquidi, permetent la difusió per la medul·la espinal, i successivament per tot el sistema nerviós central i perifèric, en funció també del tropisme i les característiques del vector viral utilitzat. L'administració intratecal utilitzant AAV ha demostrat ser eficient per transduir neurones àmpliament en tota la medul·la espinal, DRG, tronc cerebral, cerebel, entre altres en diferents espècies animals (466,478,482,494–496). Tot i ser més invasiva

que l'administració intravenosa, en l'actualitat és segura i realitzada àmpliament en animals i pacients. A diferència de la via intravenosa, amb aquest tipus d'injecció directament en el líquid cefalorraquidi es creua mecànicament la barrera hematoencefàlica, reduint l'expressió en cèl·lules no diana. No hi ha la presència d'anticossos neutralitzants, donat que el sistema nerviós central és immuno-privilegiat (497), de manera que totes les partícules virals podran potencialment transduir neurones. Per tant s'optimitza la transducció, permetent administrar dosis inferiors, disminuint la possible toxicitat i resposta immunitària (466,495,498). Interessantment, aquesta via ha demostrat ser la més eficaç de totes les vies per transduir cèl·lules de la medul·la espinal, i neurones sensibles del SNP com les dels DRG, tal com es mostra en estudis amb ratolins (467,499). Estudis en porcs i primats van demostrar que una única administració intratecal de l'AAV9 proporciona una àmplia transducció per tot el SNC, i particularment en la medul·la espinal (482,494,495). En un estudi que compara l'administració de la mateixa dosi per via intravenosa i intratecal, la injecció intratecal té una eficàcia de transducció en el SNC i neurones sensibles molt més elevada. A més, necessita una dosi 50 vegades inferior a la dosi injectada intravenosament, per aconseguir la mateixa transducció neuronal (498). Interessantment, amb l'AAV9 administrat intratecalment també es va detectar transducció en òrgans perifèrics, tot i que lògicament a uns nivells més baixos que amb una administració intravenosa, però demostrant que pot creuar bidireccionalment la barrera hematoencefàlica permetent una distribució perifèrica amb una administració intratecal (495,500).

Tenint en compte tots aquests factors, l'administració intratecal és indicada per al tractament de malalties amb afectació exclusiva en el SNC, i sobretot amb degeneració en la medul·la espinal i DRG, però també per malalties neurodegeneratives amb afectació multisistèmica en òrgans perifèrics. Actualment, la teràpia gènica amb administració intratecal ha mostrat ser eficient i segura en assajos preclínic per al tractament de malalties neurodegeneratives en models de ratolí i primats, i s'està utilitzant en assajos clínics per al tractament de la neuropatia axonal gegant (GAN) (NCT02362438) (501), la malaltia de Batten juvenil (NCT03770572) i adulta (NCT02725580).

L'administració intracisterna magna (ICM) és semblant a la intratecal, en el sentit que s'injecten els vectors virals directament en el líquid cefalorraquidi. Per la seva localització, situada entre el cerebel i la part dorsal de la medul·la oblonga, ha demostrat ser eficient per transduir àmpliament cèl·lules del SNC, tant en la medul·la espinal com el cervell (478,502). Comparada amb l'administració intratecal, no s'utilitza de forma comú en procediments clínics en pacients i és més invasiva, però no tant com la ICV, ja que no creua el parènquima. En un estudi on es compara l'administració d'AAV9 directa en el LCR amb una administració intravenosa en primats, va demostrar major transducció en el SNC utilitzant la injecció directa en el LCR amb una dosi inferior que la injecció intravascular (495). Actualment, ha demostrat ser eficient per al tractament

de models de ratolí MPSIIIA i MPSIIIB (502,503), entre altres, i s'ha provat en animals grans la seguretat, eficàcia i duració dels AAV amb aquest tipus d'administració (504).

L'administració intracerebroventricular (ICV) es realitza mitjançant una injecció directa en els ventricles laterals del cervell a través de neurocirurgia estereotàctica, lliurant els vectors virals directament en el líquid cefalorraquidi, de la mateixa manera que l'administració intratecal i intracisterna magna, per tal de que es difonguin, permetent una ampla expressió en el SNC. Inconvenientment, aquesta administració és molt invasiva, té menys capacitat de difusió per la medul·la espinal que l'administració intratecal, però en canvi, més per al cervell. Malgrat això, la penetració a la parènquima cerebral es força limitada, depenent en part del tipus de vector viral utilitzat. L'administració intracerebroventricular s'ha utilitzat exitosament per al tractament de malalties neurodegeneratives en estudis preclínics amb animals (505–507).

Algunes malalties neurodegeneratives en que únicament hi ha afectació en una zona específica del cervell o del SNC es poden abordar amb administracions localitzades directament en el lloc d'afectació per assegurar la transducció de les cèl·lules diana i evitar la transducció inespecífica i potencialment tòxica. D'aquesta manera es pot administrar dosis inferiors de partícules virals. La més freqüent és l'administració intraparenquimal, a través d'una injecció intracerebral utilitzant cirurgia estereotàctica. Normalment, aquesta administració directa al parènquima cerebral mostra una difusió limitada al voltant del punt d'administració, tot i que pot variar depenent del tipus de vector viral utilitzat. Per tant, no és indicada per malalties neurodegeneratives on hi ha més d'un teixit afectat. Inconvenientment, és molt invasiva, però malgrat això, s'està utilitzant en estudis preclínics i clínics per al tractament de malalties neurològiques com la leucodistrofia metacromàtica (NCT01801709) (508), MPSIIIA (NCT01474343) (509,510) i el Parkinson (NCT00985517, NCT03562494).

13.3. El transgèn.

Els nivells, duració i localització de l'expressió del gen terapèutic està determinat en gran part al disseny del constructe d'expressió que s'inclou en el vector viral. Donada la limitació en la capacitat d'empaquetament d'ADN dels AAV, de 4,7 kb, s'utilitza majoritàriament formes simples del gen terapèutic, sense introns, únicament amb la regió codificant d'ADN essencial per a poder sintetitzar la proteïna. En el cas de l'atàxia de Friedreich, el gen sencer de *FXN* té una mida d'aproximadament 80 kb, en canvi, la regió codificant únicament 633 pb, i per tant pot utilitzar-se en teràpia gènica amb AAV. Juntament amb el gen terapèutic, el constructe d'expressió conté elements reguladors que tenen un paper determinant en els nivells i duració de l'expressió gènica *in vivo*, a part del vector viral utilitzat. Entre les repeticions ITR, a banda del gen terapèutic, el transgèn conté essencialment un promotor i una seqüència de poliadenilació

com a elements mínims necessaris per l'expressió, entre altres elements reguladors que poden incloure.

Els promotors elegits per lliurar gens en el SNC acostumen a ser ubics, amb capacitat d'expressió en tots els tipus cel·lulars com els promotors vírics (CMV, SV40) (472,511), sintètics derivats de virus (CAG) (367,369,472), promotors humans (EF1- α , UBC, GUSB, PGK1); o poden ser específics de cèl·lules en general del sistema nerviós (PPE) (512), o d'un tipus cel·lular concret com neurones (SYN1, NSE, MeCP2) (513–515), astròcits (GFAP) (514,516), oligodendròcits (MBP) (517), o micròglia (F4/80) (518); cadascun d'ells caracteritzat per proveir una determinada intensitat i duració de l'expressió. Els promotors virals proveeixen inicialment una expressió forta i ubiqua del gen terapèutic, però cada cop són menys freqüents en teràpia gènica *in vivo* amb AAV, degut a que tendeixen a silenciar-se i a ser inactivats per la cèl·lula hoste, ja que els reconeixen com exògens, disminuint l'expressió del gen terapèutic en el temps (402,515,519). A més, al ser una seqüència vírica poden provocar una resposta immunitària i inflamatòria contra el transgèn. En el seu lloc, s'han utilitzat derivats d'aquests promotors vírics, utilitzant únicament les regions potenciadores, per fer promotors sintètics, que proveeixen una molt forta expressió, ubiqua i constitutiva com és el cas del CAG, àmpliament utilitzat en estudis de teràpia gènica, que inclou la regió potenciadora del promotor CMV (399,480). Els promotors humans tant ubics com específics de teixit o cèl·lula, normalment són menys potents que els promotors vírics, en quan a nivells d'expressió del transgèn, però no es silencien i no generen resposta immunològica, i per tant poden proporcionar una expressió més duradora del transgèn (520–522).

La seqüència de poliadenilació (poliA) és una llarga cadena de nucleòtids adenina que s'afegeix a la molècula d'ARNm que indica la fi de la transcripció, afecta a l'estabilització de l'ARNm, impedeix la seva degradació, permet l'exportació fora del nucli i que sigui traduïda a proteïna, i per tant és essencial per l'expressió del gen terapèutic. S'han utilitzat diverses seqüències poliA en teràpia gènica, les més comunes per la seva mida i assegurar una bona expressió són la de l'hormona de creixement bovina (bGH) (512,523–525), la de l'hormona de creixement humana (526), del *SV40 late* (525).

Adicionalment, es poden afegir altres elements reguladors per modular l'expressió del transgèn, tant en la part 5' com 3' del gen terapèutic. Entre el promotor i el gen terapèutic en teràpia gènica s'han utilitzat àmpliament introns per estabilitzar l'ARNm, com l'intró del virus diminut de ratolí (MVM), l'intró del virus SV40, la seqüència donadora empalmament de la beta-globina, amb l'acceptor de empalmament de la cadena pesada de la immunoglobulina (524–526), entre altres; així com la inclusió de la seqüència Kozak consens, que en eucariotes incrementa l'eficiència de reconeixement de l'ARNm al ribosoma per iniciar la traducció a proteïna; incrementant en ambdós casos l'expressió del transgèn. Entre el gen terapèutic i la poliA, s'han utilitzat elements no codificants com a reguladors post-transcripcionals, estabilitzadors de l'ARNm com l'element

regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis de la marmota americana (WPRE), que quan es transcriu crea una estructura terciària, impedit la degradació de l'ARNm, protegint el transgèn del silenciament a llarg termini, i en conseqüència contribueix a incrementar els nivells d'expressió del transgèn en combinació amb diversos promotors (512,527–530).

13.4. Seguretat de la teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats.

Un dels reptes de la teràpia gènica és la seguretat. Els AAV, a diferència d'altres vectors virals presenten més avantatges en aquest aspecte, ja que com s'ha comentat anteriorment, no són patogènics en humans, i presenten en general una lleu resposta immunològica. Tanmateix, la població humana té una exposició generalitzada a una ampla varietat de serotips AAV, podent generar una immunitat als AAV, que es caracteritza per la presència d'anticossos neutralitzants (NAbs) contra la càpsida d'AAV. Aquesta preexistència immunitària és un important repte a superar en els assajos clínics humans amb AAV, ja que el sistema immune pot eliminar els AAV i les cèl·lules transduïdes, disminuint l'eficiència de la teràpia (531). A més, es pot generar una resposta inflamatòria derivada d'aquesta resposta immunològica. Per tal de minimitzar la resposta immunitària i la neutralització del virus en els assajos clínics que actualment s'estan desenvolupant, es té en compte el serotip del AAV, el contingut del transgèn, la via d'administració, la dosi, la prevalença del serotip AAV en la població humana, entre altres.

L'administració intravenosa d'altres dosis d'AAV s'ha vist que pot induir una resposta immunològica i inflamatòria a través de cèl·lules T, i inclús en primats s'ha demostrat que pot causar toxicitat i la mort degut a una inflamació sistèmica (532–536). Recentment, la FDA va suspendre un assaig clínic en fase I per la Distròfia muscular de Duchenne que utilitzava altes dosis d'AAV9, degut a la reacció immunològica en un pacient (NCT03368742). S'administren dosis altes de manera intravenosa per al tractament de malalties neurodegeneratives perquè el número de partícules que creuen la barrera hematoencefàlica i arriben a transduir les cèl·lules diana mitjançant administració perifèrica és baix. Per evitar aquest problema s'està investigant alternatives com altres vies d'administració que permeten l'administració directa de les partícules virals creuant la barrera hematoencefàlica, disminuint l'exposició al sistema immunològic, i permetent administrar una dosi inferior sense disminuir l'eficiència de transducció a les cèl·lules diana, com per exemple l'administració intratecal que ha demostrat ser segura en aquest aspecte (466). Una alternativa en que s'està treballant és millorar les càpsides o utilitzar altres serotips o variants d'AAV menys susceptibles als anticossos neutralitzants (537,538), o amb més eficiència de transducció de les cèl·lules diana. Un estudi amb variants d'AAV (AAV-PHP-S, AAV-PHP.B i AAV-PHP.Eb) administrades intravenosament van mostrar més eficiència per creuar la barrera hematoencefàlica que el AAV9 per via intravenosa en ratolins, podent permetre administrar dosis més baixes (539–542). Tot i els prometedors resultats en ratolí, els resultats no es van traslladar a

primats (543). Altres solucions que s'estan realitzant en assajos clínics per evadir la resposta immunitària, és l'ús de fàrmacs immunosupressors com ciclosporina A, micofenolat de mofetil, tacrolimus, rituximab, sirolimus, metilprednisolona, entre altres; per reduir el nombre d'anticossos neutralitzants de manera transitòria, anteriorment i posteriorment a l'administració dels rAAV (544–546), o bé realitzar plasmafèresis en els pacients per absorbir les immunoglobulines i reduir el títol d'anticossos neutralitzants d'AAV de la sang (547).

Cada malaltia neurodegenerativa difereix en els requeriments en termes del tipus cel·lular i el nivells o rang de proteïna terapèutica necessària per tenir un resultat clínic rellevant i a l'hora segur. Per exemple, el síndrome de Rett és potencialment tractable amb teràpia gènica. El lliurament del gen MeCP2 a les neurones i glia han mostrat resultats positius millorant els símptomes de la malaltia (548,549). Però s'ha vist que la sobreexpressió de MeCP2 té efectes negatius i toxicitat (548). Per tant, és necessari controlar l'expressió del transgèn per tenir uns nivells segurs. De la mateixa manera, per l'atàxia de Friedreich, la sobreexpressió de frataxina ha demostrat ser tòxica per les cèl·lules incrementant els nivells d'estrès oxidatiu en diversos models animals i cèl·lules humanes en cultiu *in vitro*. En un estudi recent amb ratolins, es va descriure que la frataxina era ben tolerada en un rang de fins a 9 vegades superior als nivells endògens en cor. Però nivells d'expressió superiors a 20 vegades els endògens, subministrats amb una teràpia gènica amb AAVrh10 administrat intravenós amb un promotor d'expressió elevada CAG, causen toxicitat mitocondrial a través de l'alteració de l'activitat dels complexos I i II de la cadena respiratòria, l'alteració de l'estructura mitocondrial, la mort dels cardiomiòcits i fibrosis que condueix a una disfunció cardíaca (550). També s'ha vist que la sobreexpressió de frataxina és més o menys ben tolerada depenent del tipus cel·lular, teixit o òrgan. Nivells de fins a 90 vegades superiors als endògens, que són altament tòxics pel cor, són ben tolerats en fetge dels ratolins (550). Un estudi en cèl·lules humanes ha demostrat que la sobreexpressió de frataxina altera el metabolisme cel·lular, incrementa l'estrès oxidatiu i l'acumulació de ferro, de manera semblant al dèficit de proteïna típic de la patologia (551). En general, tenint en compte estudis en diferents models experimentals, nivells de frataxina entre 6 i 10 vegades superiors als nivells endògens poden causar toxicitat (185,218,268,269,551,552), mentre que nivells inferiors són ben tolerats (19,267,279,553,554). Coneixent que els nivells deficients de frataxina són patològics, i que la sobreexpressió pot causar el mateix efecte en les cèl·lules, és important tenir en compte el rang fisiològic de nivells de frataxina segur a l'hora de dissenyar una estratègia de teràpia gènica.

13.5. Èxit de la teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats.

L'èxit d'un tractament amb teràpia gènica depèn d'un disseny adequat que tingui en compte tots els factors que poden determinar-ne l'eficiència. En primer lloc cal determinar el tipus de malaltia que és vol tractar, entendre la fisiopatologia, les cèl·lules diana afectades que cal tractar i els nivells d'expressió terapèutics necessaris que cal subministrar per revertir el dèficit funcional. En malalties neurodegeneratives, on l'afectació es troba en el SNC, cal tenir en compte les barreres fisiològiques que cal afrontar per poder arribar a les cèl·lules diana com la barrera hematoencefàlica. En segon lloc, cal determinar l'estratègia terapèutica adequada tenint en compte el tipus de vector viral, la via d'administració, el tipus cel·lular diana, la composició i regulació del transgèn, la dosi, el mètode síntesi dels vectors virals recombinants, la seguretat pels pacients, l'espècie i soca d'animal en estudis preclínics, l'edat, la qual és clau en les malalties neurodegeneratives.

En els darrers anys, els AAV han estat els vectors d'elecció en la majoria d'assajos clínics efectuats per tractar patologies neurològiques. A dia d'avui s'han realitzat o s'estan realitzant un total de 244 assajos clínics emprant AAV com a vector, dels quals 104 estan en fase I, 84 en fase I/II, 25 en fase II, 4 en fase II/III, 24 en fase III. D'aquests 22 són per a malalties neurològiques, entre les que es troben l'Alzheimer, Parkinson, l'atròfia muscular espinal (SMA), malaltia de Canavan, Batten, Pompe, Danon, Gaucher, i Morquio, les mucopolisacaridosis tipus IIIA i IIIB, leucodistròfia metacromàtica, l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), adrenoleucodistrofia lligada al cromosoma X, la gangliosidosi tipus 1 i la neuropatia axonal gegant (GAN) (366,555) (**Taula 6.**). Fins ara, aquests assajos clínics han demostrat la seguretat relativa de la teràpia gènica amb AAV en més de 200 pacients amb diverses malalties neurològiques amb tot tipus d'administracions (366). Tot i això, actualment no s'ha iniciat cap assaig clínic de teràpia gènica per al tractament de l'atàxia de Friedreich.

Malaltia	Fase	Serotip AAV	Referència (Assaig clínic)	Referència (PMID)
Parkinson	Fase I, completada	AAV2	NCT00229736	-
	Fase I	AAV2	NCT01621581	-
	Fase I	AAV2	NCT01973543	30802998
	Fase I/II	AAV2	NCT00985517	23576625
	Fase II	AAV2	NCT00643890	21419704 28405611
	Fase I/II	AAV2	NCT02418598	-
	Fase I/II	AAV9	NCT04127578	26392287
Deficiència de L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa	Fase II	AAV2	NCT02926066	-
	Fase I/II	AAV2	NCT01395641	30169182
	Fase I	AAV2	NCT02852213	-
Atròfia muscular espinal	Fase I, completada	AAV9	NCT02122952	30548438
	Fase III	AAV9	NCT03505099	-
	Aprovat	AAV9	NCT03955679	29091557
Mucopolisacaridosis tipus I	Fase I	AAV9	NCT03580083	32461912
Mucopolisacaridosis tipus II	Fase I/II	AAV9	NCT03566043	32461912
Mucopolisacaridosi tipus IIIA	Fase II/III	AAVrh.10	NCT03612869	24524415
	Fase I/II	AAV9	NCT02716246	27331076
Mucopolisacaridosi tipus IIIB	Fase I/II	AAV5	NCT03300453	28713035
	Fase I/II	AAV9	NCT03315182	24720466
Malaltia de Pompe	Fase I/II	AAV1	NCT00976352	23570273
	Fase I	AAV9	NCT02240407	23732990 31796685
Alzheimer	Fase I	AAVrh.10	NCT03634007	-
	Fase II	AAV2	NCT00876863	29582053
Leucodistròfia metacromàtica	Fase I/II	AAVrh.10	NCT01801709	25758611
Malaltia de Canavan	Fase I, completada	AAV2	-	23253610
Malaltia de Batten	Fase I/II	AAVrh.10	NCT01161576	23131032
	Fase I/II	AAVrh.10	NCT01414985	23131032
	Fase I/II	AAV9	NCT02725580	-
	Fase I/II	AAV9	NCT03770572	-
Neuropatia axonal gegant	Fase I	AAV9	NCT02362438	29766026
Gangliosidosi Tipus 1 (GM1)	Fase I/II	AAV9	NCT03952637	31534909

Taula 6. Assajos clínics de teràpia gènica amb vectors virals adenoassociats (AAV) per tractar malalties neurodegeneratives.

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest estudi és **desenvolupar i avaluar preclínicament un tractament de teràpia gènica basat en un vector viral adenoassociat en un model de ratolí amb atàxia de Friedreich, amb potencial clínic i aplicabilitat translacional**. Aquest objectiu principal es subdivideix en els següents objectius específics:

1. Determinar els nivells d'expressió de frataxina i caracteritzar la patologia cel·lular mitjançant l'anàlisi ultraestructural i la funció mitocondrial de cèl·lules de pacients amb atàxia de Friedreich.
2. Generar un vector viral adenoassociat de serotip 9 (AAV9) amb la seqüència d'ADN codificant per la proteïna frataxina regulada per un promotor humà, ubic, metabòlic, de potència moderada i de llarga durada (rAAV9-FXN) per tal d'aconseguir uns nivells de frataxina en un rang fisiològic similar als nivells endògens humans no patològics.
3. Avaluar la biodistribució, duració i els nivells d'expressió de frataxina en les cèl·lules i teixits diana afectes en l'atàxia de Friedreich amb una única administració intratecal del vector rAAV9-FXN en el ratolí YG8R.
4. Avaluar l'eficàcia del tractament de teràpia gènica amb el vector rAAV9-FXN administrat intratecalment en el model de ratolí d'atàxia de Friedreich YG8R mitjançant:
 - L'avaluació del fenotip motor i sensitiu.
 - L'avaluació de la neuropatologia i cardiomiopatia.
 - L'avaluació de la funció mitocondrial.

MATERIALS I MÈTODES

1. Caracterització del gen *FXN* i la proteïna frataxina.

Les seqüències del gen *FXN* i la proteïna frataxina de les diferents espècies analitzades es van extreure de les bases de dades del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) a través del portal web (www.ncbi.nlm.nih.gov); i *Uniprot* (www.uniprot.org), respectivament.

A continuació, en la taula es detallen totes les bases de dades, eines i programes bioinformàtics, que es van utilitzar per caracteritzar el gen i la proteïna frataxina.

Eines bioinformàtiques	Portal web	Funció
BLAST (NCBI)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Alineaments de seqüències d'ADN i proteïna, i estudis de conservació entre organismes.
Jalview	-	
Clustal Omega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	
Alibaba 2.1	http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/	Predicció de llocs d'unió de factors de transcripció.
PROMO 3.0	http://algggen.lsi.upc.es/	
Consite	http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite	
Tfsitescan	http://www.ifti.org/cgi-bin/ifti/Tfsitescan.pl	
Target Scan Human 7.2	http://www.targetscan.org/vert_72/	Predicció de llocs d'unió de microARN (ARNmi).
Mirbase	http://www.mirbase.org/	
MiRWalk2.0	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/	
MitoFates	http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi	Predicció de seqüència de localització mitocondrial.
TargetP 1.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php	

Taula 7. Bases de dades, eines i programes bioinformàtics utilitzats per a la caracterització del gen *FXN* i la proteïna frataxina.

2. Caracterització de la patologia a l'atàxia de Friedreich.

2.1. Obtenció de mostres de pacients amb atàxia de Friedreich i familiars portadors i no portadors.

2.1.1. Extracció d'ADN i ARN de sang.

Es va extreure sang en tubs EDTA K2 i tubs PAXgene (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ) de pacients amb atàxia de Friedreich i familiars portadors i no portadors havent firmat el consentiment informat en el qual autoritzava la utilització d'aquestes mostres biològiques en recerca experimental. El tub EDTA K2 conté anticoagulant i permet l'extracció d'ADN de sang total. El tub PAXgene conté un estabilitzador de l'ARNm, que n'evita la seva ràpida degradació després de l'extracció.

2.1.2. Biòpsia de pell per obtenir un cultiu primari de cèl·lules fibroblasts.

Es va extreure una petita porció de pell de 3 d'individus no portadors, 4 portadors i 5 afectes d'atàxia de Friedreich. Es va dissecionar amb un bisturí estèril aproximadament 3 mm² de superfície x 1 mm de profunditat de pell de la cara interna del braç prèviament desinfectada amb etanol 96%, i es va posar en medi de cultiu HANKS estèril a temperatura ambient, òptim per a mantenir el teixit. Posteriorment, en una campana d'extracció de bioseguretat tipus II NU-425-400E (NuAire, Plymouth, MN), es va fragmentar la biòpsia de pell en trossos més petits i es van repartir en un flascó de 75 mm² durant 20 min sense medi. Seguidament, es va afegir medi de cultiu DMEM complementat amb sèrum i es van deixar a 37 °C per permetre que les cèl·lules fibroblasts s'adherissin al flascó obtenint un cultiu de cèl·lules primàries humanes *in vitro*.

En funció de la finalitat experimental, els fibroblasts humans de la pell crescuts en cultius *in vitro* es van tractar de manera diferent. Per als estudis de quantificació d'ARNm i proteïna mitjançant western-blot, es van recollir i congelar les cèl·lules en tubs d'1,5 mL a -80 °C. Per als estudis d'ultraestructura i morfologia mitjançant microscòpia tomogràfica de raigs X amb llum de sincrotró es van créixer i després vitrificar sobre reixetes de carboni cobertes d'or Quantifoil (R2/2) (Quantifoil Micro Tools GmbH, Großlobichau, Alemanya).

2.2. Quantificació dels nivells d'expressió d'ARNm de *FXN* de pacients amb atàxia de Friedreich.

2.2.1. Obtenció d'ARN i anàlisi de la integritat i puresa.

L'ARN total es va aïllar a partir de pellets congelats de cèl·lules fibroblasts humanes cultivades amb el kit de purificació d'ARN RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya), i a partir de teixits congelats de ratolí amb el kit de purificació d'ARN RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) seguint les indicacions del fabricant en ambdós casos. Totes les mostres d'ARN extretes tant humanes com de ratolí s'han analitzat mitjançant una electroforesi capil·lar amb l'instrument Agilent 2200 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) per tal de fer-ne un control de qualitat per mesurar la integritat i la puresa. La integritat es calcula mitjançant un algoritme que calcula la proporció d'ARN ribosòmic 28S respecte 18S, i que resulta d'un valor d'integritat d'ARN (RIN, *RNA integrity number*) que va de 1 a 10, on 1 és ARN altament degradat i 10 senyala la major integritat. Valors de RIN per sobre de 7 s'han adoptat com una integritat acceptable. Pel que fa a la puresa de l'ARN, la mesura de l'absorbància A260/280 per espectrofotometria es va definir entre 2 i 2,2 els valors òptims acceptables.

2.2.2. Digital-droplet PCR.

La *digital droplet* PCR (ddPCR) es va utilitzar per caracteritzar amb gran exactitud els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina humana de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica d'una família de 5 individus amb un individu afecte d'atàxia de Friedreich. Per amplificar l'ARNm de *FXN* humà es va utilitzar encebadors i sonda marcada amb el fluoròfor FAM (dHsaCPE5031641; PrimePCR ddPCR Gene Expression Probe Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), dissenyats per amplificar una regió de 93 pb entre l'exó 3 i 4, present en tots els transcrits descrits fins l'actualitat. Com a control intern es va utilitzar encebadors i sonda marcada amb el fluoròfor HEX (PrimeTime® HEX-ZEN-Iowa BlackFQ probes, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) per amplificar una regió de 227 pb entre l'exó 3 i l'exó 6 de l'ARNm de la proteïna d'unió a TATA (*TBP*) (**Taula 8**).

Gen	Nom de l'encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta (°C)	Localització en el gen	Mida de l'amplicó (pb)
	TBP-Fw	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	22	58,6	Exó 3	
<i>TBP</i>	TBP-Sonda-HEX	TGAGGATAAGAGAGCCACGAACCACGG	27	67,7	Exó 5	227
	TBP-Rv	TGGACTGTTCTCACTCTTGGC	22	60,5	Exó 5-6	

Taula 8. Llista dels encebadors i sonda utilitzats per amplificar un fragment d'ARNm de *TBP* com a control intern en la ddPCR. Ta, indica la temperatura d'anellament; Fw, *forward*; Rv, *reverse*; HEX, Hexacloro-fluoresceïna.

Per cada mostra, en un volum final de 20 µL per reacció, es va afegir 12 ng d'ARN extrets de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, els encebadors i la sonda pel *FXN* i pel *TBP* a una concentració final de 900 nM per cada encebador i 250 nM per cada sonda, 20 U/µL de l'enzim retrotranscriptasa (One-Step RT-ddPCR Advanced kit, Bio-Rad Laboratories), la ddPCR supermix (no dUTP) (One-Step RT-ddPCR Advanced kit, Bio-Rad Laboratories) que conté inhibidors d'ARNases per protegir l'ARNm de la degradació, i 15 mM de ditiotretitol (DTT) (Ecogen, Barcelona, Espanya). Posteriorment, a partir d'aquesta mescla es van generar les gotes (*droplets*) amb el reactiu *Droplet generation oil for probes* (Bio-Rad Laboratories), quedant en general una molècula d'ARN per gota. Immediatament després es van afegir en una placa de 96 pous.

Es va utilitzar el termociclador C1000 Touch™ thermal cycler (Bio-Rad Laboratories) a unes condicions de 50 °C durant 1 hora per a la reacció de retrotranscripció. Seguidament, es va realitzar la PCR d'amplificació en unes condicions de 95 °C durant 10 min, 40 cicles amb una desnaturalització de 95 °C 30 s, i un anellament/extensió a 58 °C durant 60 s, seguit finalment d'un cicle de 10 min a 98 °C per desactivar l'enzim polimerasa. Les gotes es van passar pel lector fluorescent *QX200*™ droplet reader (Bio-Rad Laboratories) i els resultats es van analitzar amb el

programa QuantaSoft v.1.6 (Bio-Rad Laboratories). Les lectures de fluorescència es van realitzar a 520 nm i 550 nm que corresponen a les longituds d'ona d'emissió dels fluoròfors FAM i HEX respectivament. Per a cada mostra es van fer duplicats i es va incloure un control de retrotranscripció, en el qual no es va afegir l'enzim retrotranscriptasa, de manera que totes les gotes positives resultants van ser producte de l'amplificació inespecífica de l'ADN genòmic. Es va quantificar el número de gotes totals i el número de gotes fluorescents, positives en l'amplificació d'ARNm. El número de còpies d'ARNm de *FXN* es va normalitzar respecte el número de còpies d'ARNm del gen control *TBP* per cada mostra.

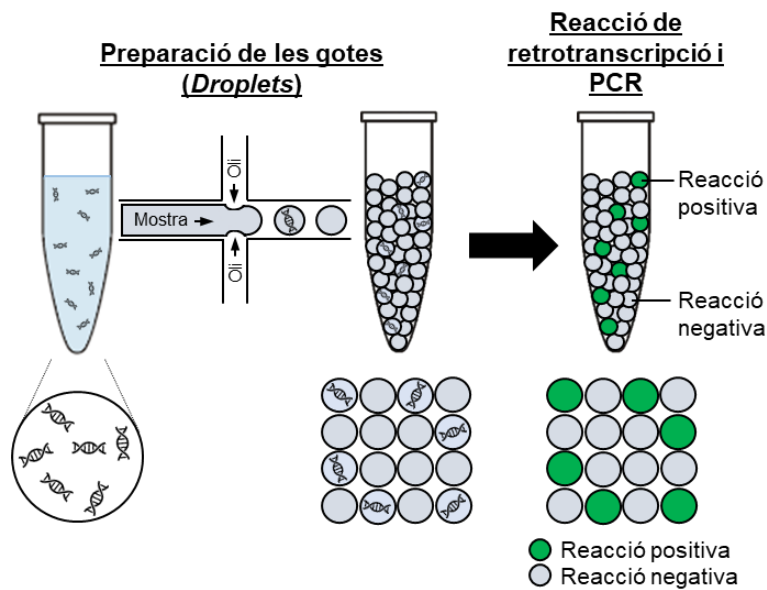


Figura 9. Esquema del processament de la mostra d'ARNm per la generació de les gotes i ddPCR.

2.2.3. PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).

Per quantificar els nivells d'ARNm total de frataxina de cèl·lules fibroblasts es van dissenyar encebadors i sonda marcada amb el fluoròfor FAM (PrimeTime® FAM-ZEN-Iowa BlackFQ probes, Integrated DNA Technologies) entre els exons 3 i 4, per amplificar un fragment de 139 pb, compartit pels 4 transcrits de *FXN* humans descrits fins l'actualitat (**Taula 9**).

L'ARN total es va aïllar de pellets de cèl·lules fibroblasts humanes congelades amb el kit de purificació d'ARN RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguint les indicacions del fabricant (veure apartat 2.1.1 de materials i mètodes). A continuació, es va sintetitzar l'ADNc amb el kit PrimeScript™ RT reagent (Takara Bio, Shiga, Japó), que conté l'enzim retrotranscriptasa PrimeScript RTase per passar l'ARN a ADN complementari. 200 ng d'ARN total es van mesclar amb el buffer PrimeScript 1X, PrimeScript RT Enzyme Mix I, 25 pmol Oligo dT Primer, 50 pmol de Random 6 mers en un volum final de 10 µL i es van incubar en el termociclador a 37 °C durant 15 min realitzant la retrotranscripció, i 85 °C durant 5 s per inactivar per calor l'enzim retrotranscriptasa.

La reacció de qRT-PCR es va realitzar en el termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Suïssa) utilitzant placa de 96 pous en una reacció amb un volum final de 10 µL, que contenia 10 ng de ADNc, els encebadors a una concentració final de 900 nM cadascun i 250 nM de sonda, i la polimerasa TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Les condicions de termociclador que es van utilitzar van consistir en un cicle de 95 °C durant 10 minuts i 40 cicles de 95 °C durant 15 segons i 60 °C durant 1 minut. L'anàlisi de la quantificació relativa es va fer mitjançant el mètode comparatiu Ct ($\Delta\Delta Ct$). Com a control intern d'expressió endògena es van normalitzar els valors de qRT-PCR obtinguts de l'expressió d'ARNm de frataxina total amb els valors d'expressió d'ARNm del gen beta 2-microglobulina (*B2M*) (Hs.PT.58v18759587, Integrated DNA Technologies). Es van realitzar triplicats de cada mostra pel gen d'interès i el gen control.

Gen	Nom de l'encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta (°C)	Localització en el gen	Mida de l'amplicó (pb)
	hFXN & mFxn_Fw	TTGAAGACCTTGCAGACAAG	20	55,9	Exó 3	
<i>FXN</i>	hFXN & mFxn_Sonda FAM	AGGAACCTACGTGATCAACAAGCAGAC	27	57,1	Exó 4	139
	hFXN & mFxn_Rv	AGCCAGATTTGCTTGTTTGG	20	57,2	Exó 4	
	B2M_Fw	GGACTGGTCTTCTATCTCTTGT	23	57,3	Exó 2	
<i>B2M</i>	B2M_Sonda-FAM	CCTGCCGTGTGAACCATGTGACT	23	65,3	Exó 2	143
	B2M_Rv	ACCTCCATGATGCTGCTTAC	20	57,7	Exó 3-4	

Taula 9. Llista dels encebadors i sondes utilitzats per amplificar ARNm de *FXN* i *B2M* en la qRT-PCR. Ta, indica la temperatura d'anellament; Fw, *forward*; Rv, *reverse*; FAM, amidada de fluoresceïna.

Es van quantificar també els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina en cèl·lules mononuclears sanguínies humanes utilitzant el mateix procediment, reactius i condicions de reacció i termociclador però amb els encebadors i sonda per la frataxina humana (dHsaCPE5031641; PrimePCR ddPCR Gene Expression Probe Assay, Bio-Rad Laboratories), i la proteïna d'unió a TATA (TBP) com a control intern d'expressió (**Taula 8**).

2.3. Criomicroscòpia tomogràfica de raigs X a partir de llum de Sincrotró.

Primer es van cultivar les cèl·lules fibroblasts humanes d'individus no portadors, individus portadors i individus amb atàxia de Friedreich, sobre reixetes Quantifoil R2/2, circulars, de carboni, cobertes d'or i amb forats de 2 µm separats entre si per 2 µm (Quantifoil Micro Tools GmbH), durant 24 h a 37 °C, amb medi de cultiu DMEM complementat amb sèrum. A continuació, després de 2 rentats amb PBS 1X a 37 °C, es va afegir una petita alíquota amb marcadors fiducials d'or que serveixen per poder alinear les projeccions angulars en la reconstrucció tomogràfica. Els marcadors fiducials es van posar a la superfície del Quantifoil, i 30 segons després es va eliminar l'excés de líquid utilitzant paper de filtre Whatman #1 per deixar

únicament una capa fina de líquid cobrint les cèl·lules. Immediatament es van vitrificar les mostres en la càmera de criopreparació Leica EM-CPC (Leica, Wetzlar, Alemanya), submergint la reixeta en età líquid i mantenint-les a $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ amb nitrogen líquid. Seguidament es va comprovar la qualitat de les reixetes vitrificades amb el microscopi de llum visible Zeiss Axio Scope (Zeiss, Oberkochen, Alemanya), utilitzant un adaptador LINKAM CMS196 per mantenir les mostres criopreservades, i així seleccionar les reixetes més ben conservades, amb la confluència i el gruix de gel adequats. Posteriorment, es van transferir les mostres a la cambra del microscopi de transmissió de rajos X (TXM) en condicions criogèniques de la línia MISTRAL del Sincrotró ALBA (**Figura 10**).

En el sincrotró els electrons són accelerats a la velocitat de la llum en un circuit circular magnètic. Com a producte es generen una sèrie de llums tangencials, de les quals la línia MISTRAL aïlla els rajos X, que es van fer passar a través de la mostra després de ser monocromatitzats regulant la intensitat d'energia de fotons a 520 eV. La llum difractada que resulta de travessar la mostra, es va projectar en una càmera CCD retroiluminada, refredada termoelèctricament, formant una imatge magnificada de la mostra (556,557) (**Figura 10**).

Es va seleccionar l'àrea de la cèl·lula en la qual es va adquirir la tomografia mitjançant un objectiu amb un ample de banda exterior de 40 nm. El microscopi TXM permet inclinar la mostra, de manera que es van poder adquirir una sèrie de projeccions de la mostra amb diferents graus d'inclinació, podent obtenir una reconstrucció tridimensional. Un cop seleccionada l'àrea cel·lular d'interès es va adquirir 121 projeccions, des de -60 a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, una per cada angle de rotació de la mostra, amb un camp de visió de $10\text{-}15 \times 10\text{-}15\text{ }\mu\text{m}^2$, i una inclinació total de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mida efectiva del píxel a les imatges va ser de 13 nm (556,557).

La desconvolució i alineament de la sèrie de tomografies inclinades adquirides es va fer amb el programa IMOD (University of Colorado, Boulder, CO) (558), gràcies als marcadors fiducials. Les reconstruccions finals es van realitzar mitjançant la tècnica de reconstrucció iterativa simultània (SIRT) amb el programa TOMO3D (CSIC, Madrid, Espanya) (559). La visualització, processament i anàlisi de les imatges de les tomografies mitjançant la identificació i marcatge dels diferents orgànuls cel·lulars es va realitzar amb el programa AMIRA (Thermo Fisher Scientific). Finalment, les imatges volumètriques tridimensionals i la quantificació de l'àrea i els volums cel·lulars es van realitzar amb el programa Chimera (University of California, San Francisco, CA) (556,557,560).

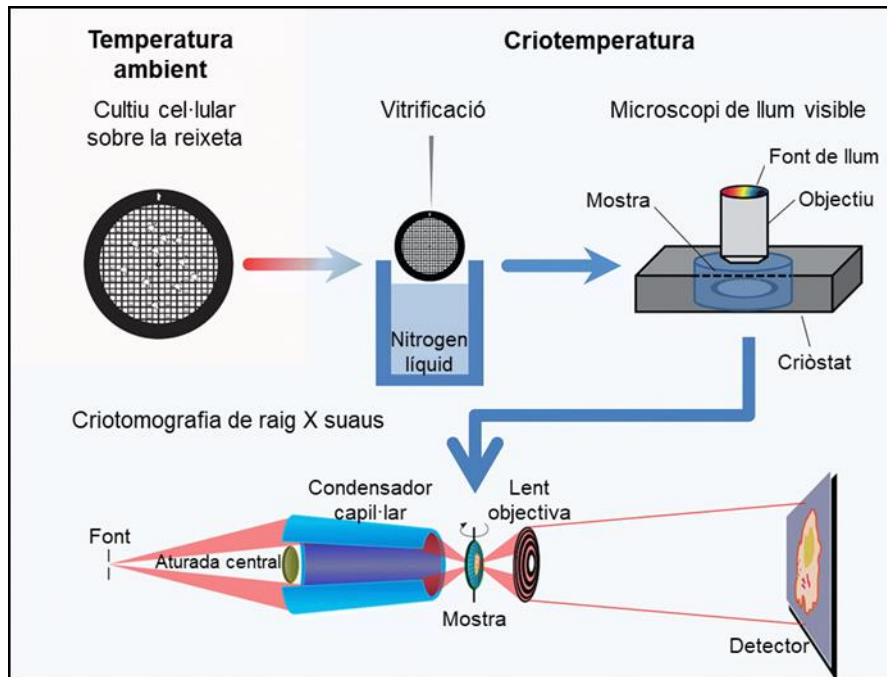


Figura 10. Esquema de la metodologia utilitzada per a l'anàlisi ultraestructural de cèl·lules fibroblasts de pacients FRDA per microscòpia tomogràfica de raigs X en la línia MISTRAL del Sincrotró ALBA. Figura adaptada de (557).

3. Model de ratolí amb atàxia de Friedreich.

Per desenvolupar aquest estudi, es va utilitzar ratolins transgènics hemizigots YG8R (YG8R Tg/-) com a model animal d'atàxia de Friedreich i ratolins salvatges (WT) com a control, ambdós de la soca C57Bl6/J (192).

Els ratolins YG8R de la soca B6.Cg-Fxn^{tm1Mkn} Tg(FXN)YG8Pook/J, generats pel Dr. Mark Pook (Brunel University London), són *knock-out* pel gen endogen de la frataxina del ratolí (*Fxn*^{-/-}), i es van rescatar amb un transgèn introduït mitjançant un cromosoma artificial de llevat (YAC), amb dues còpies en tàndem del gen complet humà *FXN*, ambdós amb expansions patològiques del triplet GAA dins l'intró 1, concretament de 90 i 190 repeticions (192,278). D'aquesta manera, els ratolins YG8R expressen únicament frataxina humana i mostren una afectació del fenotip motor-sensitiu i una patologia multisistèmica, moderada, però progressiva, similar als pacients amb atàxia de Friedreich, esdevenint actualment el millor model animal de la malaltia (192).

3.1. Establiment i manteniment de la colònia de ratolins.

Es van adquirir dues parelles reproductores de ratolins transgènics hemizigots YG8R (#012253 a The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) i es van importar al Centre d'Experimentació Animal de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP) a Can Ruti, Badalona per establir una colònia.

Per obtenir el número de ratolins suficient per poder realitzar l'estudi es van fer creuaments entre ratolins YG8R transgènics hemizigots (Tg/-). La descendència resultant d'aquest creuament pot donar ratolins amb tres genotips diferents, tots ells *knock-out* per la frataxina endògena de ratolí i que es diferencien en funció del número de còpies del transgèn que hereten. Per tant, s'obtenen ratolins homozigots (Tg/Tg) amb dues còpies del transgèn humà, una a cada al·lel, i per tant 4 còpies del gen de *FXN* humà; o ratolins hemizigots (Tg/-) amb una sola còpia del transgèn humà en un dels al·lells i per tant amb 2 còpies del gen humà de frataxina. Els ratolins KO per la frataxina endògena i que no tenen cap còpia del transgèn no arriben a néixer, tenen letalitat embrionària, degut a que la falta total de frataxina és essencial pel desenvolupament embrionari.

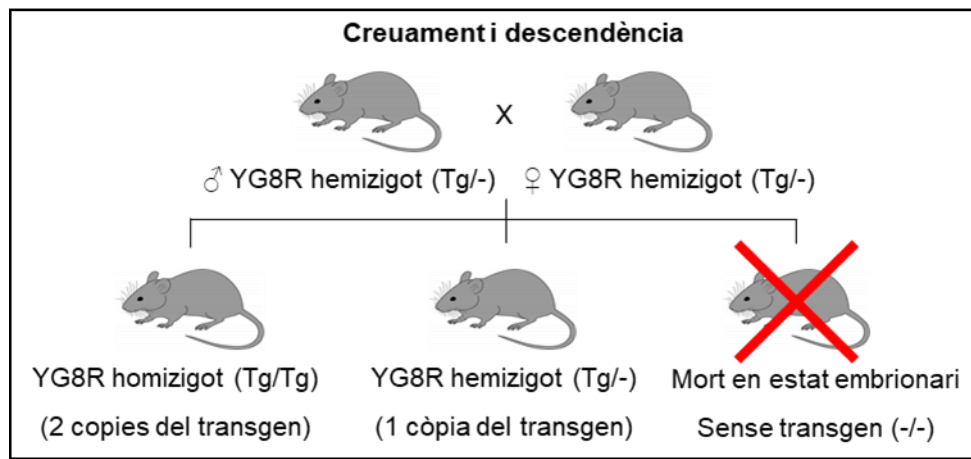


Figura 11. Esquema del creuament realitzat i genotips que s'obtenen en la descendència.

Per desenvolupar aquest estudi de teràpia gènica es van utilitzar els ratolins transgènics hemizigots YG8R (Tg/-) perquè contenen menys còpies del gen *FXN* i, per tant, tenen nivells més baixos de proteïna frataxina que els ratolins homozigots YG8R pel transgèn (Tg/Tg). Això proporciona un fenotip patològic més greu en els ratolins transgènics hemizigots YG8R (Tg/-), més semblant a l'atàxia de Friedreich (200,289). En els estudis de quantificació d'ARNm i proteïna frataxina, i en l'avaluació de la funció mitocondrial es van incloure ratolins homozigots (Tg/Tg) com a control de sobreexpressió de frataxina.

Es van utilitzar un total de 147 ratolins, dels quals 39 eren ratolins WT C57Bl6/J, 90 eren ratolins transgènics hemizigots (YG8R Tg/-) i 18 ratolins transgènics homozigots (YG8R Tg/Tg).

Els ratolins es van mantenir en condicions SPF-like a una temperatura entre 20-23 °C, humitat controlada entre 45-60% i amb cicles de llum-fosc de 12 hores. Es van establir en gàbies tancades NexGen Cages de 194 mm x 130 mm x 381 mm (Allentown Inc, Allentown, NJ) en un *rack* ventilat NexGen mouse 500 (Allentown Inc). L'interior de les gàbies contenia encenall de fusta absorbent Lignocel 3-4S (J.Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Alemanya), que es canviava setmanalment. Els ratolins tenien accés il·limitat a aigua autoclavada i pinso per rosegadors

irradiat amb 18% de proteïna Teklad 2918 (Envigo, Indianapolis, IN). El *rack* ventilat es va mantenir en pressió positiva durant el creixement i manutenció de la colònia, i es va canviar a pressió negativa quan es van administrar els vectors virals adenoassociats per tal d'evitar-ne la difusió fora de les gàbies.

Tots els procediments amb animals es van realitzar estrictament d'acord amb la Directiva del Consell de la Comunitat Europea i les regulacions governamentals (Decret de la Generalitat de Catalunya, 214/97, de 30 de juliol) i van ser aprovats prèviament pel comitè ètic sobre experimentació animal de l'Institut d'investigació Germans Trias i Pujol (IGTP).

3.2. Genotipatge.

3.2.1. Extracció d'ADN de la cua de ratolins.

Per conèixer el genotip de ratolins, es va tallar una petita porció de la punta de la cua dels ratolins, d'uns 3 mm, i es va congelar i mantenir immediatament en gel sec per evitar la degradació de l'ADN. L'ADN es va extreure amb el kit de purificació d'ADN Maxwell® 16 (Promega Corporation, Madison, WI) i l'instrument Maxwell® 16 (Cat.# AS2000; Promega Corporation) seguint les instruccions del kit. A continuació, es va quantificar la concentració d'ADN i la puresa de l'extracció a l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) (561).

3.2.2. PCR per comprovar el fons genètic *knock-out* pel gen *Fxn*.

Per comprovar que els ratolins YG8R adquirits a The Jackson Laboratory eren *knock-out* en homozigosi pel gen endogen de la *Fxn* murina i mantenien aquesta condició en la descendència, es va realitzar una PCR a partir de 10 ng d'ADN extret de la cua de ratolí amb els encebadors específics WJ5 a 0,4 µM de concentració final, WN39 a 0,4 µM i WC76 a 0,2 µM (**Taula 10**). Es va utilitzar l'ADN polimerasa MyTaq™ DNA Polymerase 1X (Bioline, Londres, Regne Unit) i el MyTaq reaction buffer 1X, que conté una concentració final d'1 mM dNTPs i 3 mM MgCl₂. Les condicions del termociclador van ser d'un cicle de desnaturalització de 95 °C durant 3 min, seguit de 30 cicles amb 95 °C 15 s, 55 °C durant 15 s, 72 °C 20 s, i finalment un cicle d'elongació a 72 °C durant 30 s. Els resultats de l'amplificació de PCR es van revelar per electroforesi en gel d'agarosa al 2%. Es va incloure com a control un ratolí WT pel gen *Fxn* i un ratolí heterozigot, que conté un al·lel WT i un al·lel KO i que es va obtenir amb el creuament entre un ratolí YG8R i un ratolí WT. La mida de l'amplicó de l'al·lel WT és de 520 pb i la de l'al·lel KO 245 pb.

Encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta (°C)	Localització en el gen	Mida de l'amplicó
WJ5	CTGTTTACCATGGCTGAGATCTC	23	58,9	Intró 3	WT: 520 pb KO: 245 pb
WN39	CCAAGGATATAACAGACACCATT	23	56	Intró 3	
WC76	CGCCTCCCCTACCCGGTAGAATTC	24	66	Intró 3	

Taula 10. Llista dels encebadors utilitzats per comprovar el genotip del gen endogen *Fxn* dels ratolins YG8R. Ta, indica la temperatura d'anellament.

3.2.3. Quantificació del número de còpies del transgèn.

La quantificació del número de còpies del transgèn, que conté dues còpies en tàndem del gen humà *FXN*, es va realitzar mitjançant PCR quantitativa a temps real (qPCR). D'aquesta manera es va poder diferenciar els ratolins transgènics hemizigots YG8R (Tg/-), dels ratolins transgènics homozigots (Tg/Tg) amb el doble de còpies del transgèn. La PCR quantitativa es va realitzar a partir de 10 ng d'ADN genòmic extret de cua de ratolí amb 0,2 µM de cadascun dels encebadors *forward* i *reverse* i TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus) 1X (Takara Bio). Els encebadors específics del gen d'interès es van dissenyar per amplificar 102 pb de l'intró 1 del gen humà *FXN* (**Taula 11**). Aquestes seqüències són específiques del gen humà *FXN* i no es troben en el gen endogen murí *Fxn*. Com a control intern de número de còpies, es va amplificar una regió de 74 pb del gen apolipoproteïna B-100 isoforma X1 (*ApoB*) del genoma del ratolí (**Taula 11**). La PCR quantitativa es va realitzar amb l'instrument LightCycler 480 (Roche Diagnostics) en unes condicions de termociclador de 95 °C durant 30 s, i 40 cicles de 95 °C durant 5 s, 60 °C durant 20 s i 72 °C durant 20 s. Es va incloure de rutina com a controls 2 ratolins de genotip conegut hemizigots i 2 ratolins homozigots pel transgèn. Es van fer triplicats de cada mostra pel gen d'interès i el gen control. El número de còpies del transgèn es va calcular mitjançant la quantificació relativa (RQ) normalitzada al número de còpies conegut de les mostres de ratolins control hemizigots utilitzant el mètode comparatiu Ct ($\Delta\Delta Ct$) (561).

Gen	Nom de l'encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta (°C)	Localització en el gen	Mida de l'amplicó (pb)
<i>FXN</i>	hFXN transgèn_Fw	GAACCTCAAATTAGTTCCTTCTTCTTC	27	58,9	Intró 1	102
	hFXN transgèn_Rv	CACAGCCATTCTTTGGGTTC	21	58	Intró 1	
<i>ApoB</i>	ApoB_Fw	CACGTGGGCTCCAGCATT	18	60,4	Exó 26	74
	ApoB_Rv	TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG	22	59	Exó 26	

Taula 11. Llista dels encebadors utilitzats per quantificar el número de còpies del transgèn humà dels ratolins YG8R per qPCR. Ta, indica la temperatura d'anellament; Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

3.2.4. TP-PCR basada en fluorescència.

Per comprovar que els ratolins YG8R contenen les expansions GAA en l'intró 1 del gen *FXN*, es va fer una *triplet repeat primed* PCR (TP-PCR) basada en fluorescència utilitzant tres encebadors específics (**Taula 12**). L'encebador *forward* marcat amb el fluoròfor FAM s'uneix específicament en una regió de l'intró 1 a 5' del triplet de repeticions GAA. L'encebador *reverse* dissenyat per unir-se a les repeticions GAA en la cadena complementària, consta de 6 unitats del triplet de

repetició i una cua a 5' que és utilitzada per a que s'uneixi específicament un segon encebador *reverse*, que evita l'escurçament progressiu dels productes de PCR durant els subseqüents cicles (Taula 12). La PCR es va realitzar a partir de 50 ng d'ADN genòmic extret de cua de ratolí, 0,3 µM de cadascun dels encebadors, 1 U de l'ADN polimerasa Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1X del tampó de PCR (Thermo Fisher Scientific), 1,5 mM de MgCl₂ i 1 mM de dNTPs. Les condicions de termociclador van ser d'un cicle de 7 min a 95 °C, seguit de 40 cicles de 40 s a 95 °C, 1 min a 58 °C, 3 min a 72 °C i una extensió final de 10 min a 72 °C. L'anàlisi del producte fluorescent de PCR es va realitzar en el seqüenciador d'ADN fluorescent amb làser automatitzat ABI 3130XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), utilitzant el marcador estàndard intern ROX-GS500 (Applied Biosystems, Norwalk, CT) i el programa GeneScan 3.1 (Thermo Fisher Scientific). Valors en un rang de 200 a 7000 unitats de fluorescència es van considerar de confiança. Com a controls es va incloure una mostra d'ADN humana d'un individu a no portador, d'un individu afecte d'atàxia de Friedreich i un ratolí WT.

Nom de l'encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta (°C)	Localització en el gen
FAM-hFXN_Int1_Fw	GGGATTGGTTGCCAGTGCTTAAAAGTTAG	29	58,9	Intró 1
hFXN_Int1.Exp_Rv + Cua	TACGCATCCAGTTTGAGACGTTCTTCTTCTTCTTC	39	45,8	Intró 1
Cua Rv	TACGCATCCAGTTTGAGACG	21	60,4	-

Taula 12. Llista dels encebadors utilitzats per comprovar l'expansió del triplet de repeticions GAA en el gen *FXN* dels ratolins YG8R. Ta, indica la temperatura d'anellament; Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

3.2.5. PCR per comprovar el número de repeticions GAA.

Per quantificar el número de repeticions del triplet GAA en l'expansió dins l'intró 1 del gen humà transgènic *FXN* en els ratolins YG8R, es va fer una PCR utilitzant dos encebadors específics, dissenyats a 5' i 3' del triplet de repeticions GAA. En una reacció de 20 µL de volum final, es va mesclar 50 ng d'ADN extret de cua de ratolí, 0,2 µM de cadascun dels encebadors, 1% de formamida, 0,1 U de l'ADN polimerasa MyTaq DNA Polymerase (Bioline) i 1X del tampó MyTaq reaction Buffer (Bioline). Les condicions de termociclador que es van utilitzar van ser un cicle de desnaturalització de 3 min a 95 °C, seguit de 30 cicles de 30 s a 95 °C, 35 s a 62,5 °C, 1 min a 72 °C, i finalment un cicle d'elongació de 7 min a 72 °C. El producte de PCR es va analitzar mitjançant electroforesi capil·lar en el bioanalitzador 2200 TapeStation (Agilent Technologies) i el programa informàtic 2200 TapeStation (Agilent Technologies). Com a controls es va incloure mostres d'ADN humanes d'individus no afectes d'atàxia de Friedreich i una mostra d'ADN de ratolí WT. D'acord amb The Jackson Laboratory del ratolí WT no s'hauria de mostrar cap producte amplificat, mentre que del ratolí YG8R s'haurien d'obtenir de 3-4 bandes entre ~810-1.050 bp. Per calcular el número exacte de repeticions GAA es va aplicar la fórmula: [(Número

de pb de la banda producte de la PCR resultant) – 450] /3. On 450 són els nucleòtids de l'amplicó que no corresponen a les repeticions GAA, 195 bp des de l'encebador *forward* fins l'inici de les repeticions GAA i 255 bp des de les repeticions fins l'encebador *reverse*. Finalment, es divideix entre 3 perquè es tracta d'un triplet de nucleòtids.

Nom de l'encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta °C	Localització en el gen
hFXN_NG_Int1_Fw	GGGATTGGTTGCCAGTGCTTAAAAGTTAG	29	66	Intró 1
GAA-R_FXN_EXP_Rv	GATCTAAGGACCATCATGGCCACACTTGCC	30	72	Intró 1

Taula 13. Encebadors utilitzats per quantificar el número de repeticions trinucleòtides GAA en el gen *FXN* dels ratolins YG8R. Ta, indica la temperatura d'anellament; Fw, *forward*; Rv, *reverse*.

4. Generació de vectors d'expressió de frataxina.

4.1. Clonatge.

Per tal de generar vectors d'expressió de frataxina es va utilitzar el plasmidi d'expressió per cèl·lules de mamífer pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific), que conté l'origen de replicació (pUC ori) per poder replicar-se en bacteries i obtenir un alt número de còpies; un gen de resistència a ampicil·lina regulat pel propi promotor del gen, per poder fer la selecció de les colònies que es transformen amb el plasmidi i el lloc múltiple de clonatge (MCS), on hi ha diversos llocs de restricció d'enzims específics amb els quals es pot tallar l'ADN i introduir altres fragments d'ADN. El plasmidi es va utilitzar com a motlle, a partir del qual es van modificar els seus elements mitjançant clonació per tal d'expressar la proteïna frataxina.

Per introduir la seqüència codificant de la frataxina (donada pel Dr. Mark Pook, Brunel University London) i els elements reguladors en el plasmidi d'expressió i així expressar la proteïna frataxina, es va utilitzar el sistema de clonatge In-Fusion (In-Fusion® HD Cloning Kit, Takara Bio). Per una banda, es va amplificar el plasmidi d'expressió circular mitjançant PCR invertida amb l'ADN polimerasa d'alta fidelitat CloneAmp™ HIFI DNA polymerase (Takara Bio), que ja conté el tampó de la reacció i dNTPs; i encebadors específics, dissenyats en el lloc on es volia incloure l'insert, per tal d'obtenir com a producte d'amplificació el plasmidi linealitzat. Paral·lelament, es va amplificar també per PCR el fragment d'ADN que es volia inserir en el plasmidi amb la mateixa ADN polimerasa i amb encebadors específics que contenen 15 pb de cua en la part 5', que són complementaris als 15 pb dels extrems del plasmidi lineal amplificat per PCR invertida. Les condicions de termociclador de la PCR que es van utilitzar en general van ser una desnaturalització inicial de 3 min a 95 °C, seguit de 35 cicles de 15 s a 98 °C, 20 s a la temperatura d'anellament adequada per cada conjunt d'encebadors, i el temps d'elongació necessari per cada amplicó a 72 °C. Finalment es va fer un cicle d'elongació a 72 °C amb un temps que depenia de

la mida dels amplicons, però que es va calcular a 1 min/kb. Les condicions de PCR es van canviar adaptant-les a cadascun dels amplicons degut a la seva longitud de seqüència nucleotídica i a les característiques d'anellament dels encebadors dissenyats per cadascun dels clonatges.

El producte de la PCR es va separar per mida en una electroforesi en gel d'agarosa entre 0,8-2%, depenent de la mida dels amplicons esperats (veure apartat 4.3.1 de materials i mètodes). Es van tallar i recollir les bandes que contenien els amplicons específics corresponents al plasmidi linealitzat i l'insert que es volia introduir. Aquestes bandes es van purificar en columna d'afinitat d'ADN amb el kit NucleoSpin®PCR clean-up & Gel extraction (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA), després d'haver degradat i eliminat l'agarosa seguint les indicacions del kit.

Un cop purificats els amplicons, es va realitzar el clonatge amb l'enzim *In-Fusion HD Enzyme IX* (Takara Bio) en una reacció amb 75 ng del plasmidi i 75 ng d'insert en un volum final de 10 µL i incubant la mescla a 50 °C durant 15 min. L'enzim *In-Fusion* actua de recombinasa i lligasa, empalmant els 15 pb dels extrems de l'insert amb els extrems del vector linealitzat, de manera que es va obtenir el plasmidi amb l'insert circularitzat. Les quantitats de plasmidi i insert es van modificar en casos puntuals en funció de la mida dels amplicons per tal d'optimitzar la reacció de clonatge.

La tècnica de clonatge *In-Fusion* va permetre realitzar combinacions de disseny diferents, on segons la conveniència del clonatge es van dissenyar els encebadors amb cua de 15 pb per amplificar el plasmidi, enlloc de l'insert. A més, la tècnica va permetre introduir mutacions puntuals en la seqüència del vector, dissenyant encebadors amb cua amb canvis nucleotídics respecte la seqüència motlle d'ADN. La majoria de clonatges realitzats van consistir en introduir diferents seqüències d'ADN reguladores a 5' i 3' de la seqüència codificant de frataxina com promotors i elements de regulació postranscripcional, entre altres. En alguns vectors es va clonar enlloc de la seqüència codificant de frataxina, la seqüència codificant del gen de la luciferasa *firefly* (1.653 pb) per poder determinar mitjançant assajos de bioluminescència en cèl·lules *in vitro* l'eficiència d'expressió que aporten els diferents elements reguladors introduïts en el vector, i posteriorment determinar la biodistribució *in vivo* dels vectors virals AAV9 injectats en els ratolins.

4.2. Transformació en cèl·lules bacterianes competents.

La transformació en cèl·lules bacterianes competents es va realitzar mitjançant xoc tèrmic, on es va introduir el plasmidi circular clonat en l'interior de bactèries per produir-ne un gran número de còpies. Es va mesclar 2,5 µL del producte de la clonació amb 50 µL de bactèries competents Stellar Competent cells (Takara Bio) i es van incubar durant 30 min en gel. Les Stellar Competent cells són bactèries *Escherichia coli* (*E. coli*) de la soca HST08, aptes per tenir una eficiència de

transformació elevada i amb absència del gen que talla l'ADN metilat. Com a control de clonatge es va utilitzar bacterïes competents transformades amb una mescla d'insert i vector però sense l'enzim recombinasa *In-Fusion*. A continuació es va realitzar el xoc tèrmic a 42 °C durant 45 s en el bany maria, i immediatament en van posar en gel durant 2 min, per així permeabilitzar la paret bacteriana i permetre l'entrada del plasmidi clonat en l'interior de la bactèria. Es va créixer la bactèria en medi SOC en agitació a 37 °C durant 1 h per permetre que les bacterïes transformades expressin el gen de resistència a l'antibiòtic ampicil·lina, que conté el plasmidi. Seguidament, es van escampar 50 µL del cultiu de bactèria en plaques de cultiu LB-agar amb ampicil·lina (50 µg/mL) i es van incubar a 37 °C tota la nit. Posteriorment, les colònies crescudes potencialment transformades amb el plasmidi d'expressió clonat, es van créixer en cultiu bacterià líquid LB i ampicil·lina (50 µg/mL) a 37 °C en agitació durant tota la nit per obtenir un gran número de bacterïes transformades i així multiplicar el número de còpies del plasmidi d'expressió. Finalment, es va extreure, aïllar i purificar l'ADN plasmídic clonat del cultiu bacterià en columnes iòniques carregades positivament dels kits d'extracció i purificació Maxiprep, Midiprep, Miniprep (Qiagen), seguint les instruccions del kit.

4.3. Comprovació de l'eficiència del clonatge.

Després de la purificació dels vectors d'expressió clonats es va comprovar la concentració i la puresa mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). L'interval de puresa ($A_{260/280}$) acceptat va ser entre 1,7 i 2. Posteriorment es va comprovar l'eficiència de la clonació tallant el vector amb enzims de restricció específics o mitjançant PCR amb encebadors específics dissenyats per amplificar un amplicó des de l'interior de l'insert a l'interior del vector i comprovar-ne també la direccionalitat. Ambdós mètodes es van córrer en una electroforesi en gel d'agarosa per diferenciar el producte de cada reacció per mida dels fragments d'ADN resultants (veure apartat 4.3.1 de materials i mètodes). Quan es va verificar l'eficiència de clonació de cadascuna de les colònies bacterianes transformades, es va seqüenciar el vector amb l'insert per comprovar que no hagués variacions de nucleòtids puntuals degudes a errors de l'ADN polimerasa en la reacció PCR d'amplificació inicial, o en la replicació bacteriana que afectin l'expressió de la proteïna frataxina esperada (veure apartat 4.3.2 de materials i mètodes).

Aquest procediment es va realitzar per cadascun dels vectors d'expressió generats, aplicant els canvis convenients en la reacció de PCR o enzims de restricció en funció de cadascuna de les seqüències de plasmidi i insert determinades que es van clonar.

4.3.1. Electroforesi en gel d'agarosa.

Els productes de PCR dels plasmidis linealitzats, inserts i fragments per comprovar l'eficiència de la clonació, així com els productes de digestió d'ADN amb enzims de restricció es van córrer per electroforesi en gels d'agarosa. Aquests gels contenien entre 0,8-2% d'agarosa (Ecogen), en funció de la mida dels amplicons, tampó Tris-Borat-EDTA (TBE), i RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del sud), per marcar l'ADN i visualitzar-lo posteriorment a través del transil·luminador d'UV (Uvitec, Cambridge, Regne Unit). Per carregar l'ADN del producte de PCR i les digestions en el gel d'agarosa, abans es va mesclar amb un tampó de càrrega 6x Orange DNA loading dye solution (Thermo Fisher Scientific). Es va aplicar una corrent elèctrica entre 90 - 110 V per separar els fragments d'ADN per mida i poder diferenciar les bandes dels amplicons resultants. Com a marcadors de mida es van utilitzar Hyperladder I (1.000 bp – 10.000 bp) i Hyperladder IV (100 bp – 1.000 bp) (Bioline).

4.3.2. Seqüenciació per Sanger.

En primer lloc es va realitzar una PCR de seqüenciació amb el kit de seqüenciació BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) a partir de 50 ng d'ADN i un encebador específic que permet cobrir la seqüència d'ADN a seqüenciar i amb les condicions de termociclador d'un cicle a 95 °C durant 5 min, i 30 cicles a 95 °C 10 s i 60 °C 4 min. Posteriorment, es va precipitar l'ADN amb EDTA 4 mM, acetat de sodi 0,1 M i etanol absolut fred i es va centrifugar durant 30 min a 4 °C. Seguidament, es va resuspendre amb etanol 70% i centrifugar de nou a 4 °C durant 5 min. Finalment, l'ADN es va resuspendre en formamida i es va seqüenciar amb l'analitzador ABI Prism 3130 (Thermo Fisher Scientific) de la plataforma de Genòmica de l'IGTP. Els resultats de seqüenciació es van analitzar amb els programes informàtics SeqMan (DNASTAR Lasergene, Madison, WI) i Sequence Scanner (Thermo Fisher Scientific).

5. Avaluació de l'expressió de frataxina recombinant humana dels vectors d'expressió sintetitzats en cultiu cel·lular *in vitro*.

5.1. Cultius cel·lulars.

Es van utilitzar cultius primaris de cèl·lules fibroblasts humanes extretes de pacients FRDA, i línies cel·lulars immortalitzades de neuroblastoma humanes (SH-SY5Y) (#CRL-2266, ATCC, Manassas, VA), neuroblastoma de ratolí (N2a) (#CCL-131, ATCC), i cèl·lules humanes embrionàries de ronyó (HEK 293) (#CRL-1573, ATCC). Les cèl·lules es van cultivar en medi Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví inactivat (Thermo Fisher Scientific), 2 mM de L-glutamina (Thermo

Fisher Scientific), penicil·lina i estreptomina (50 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific), mantingudes en un incubador a 37 °C, 95% d'humitat i 5% de CO₂.

Per a la transfecció de les línies cel·lulars amb els vectors d'expressió sintetitzats per tal d'expressar frataxina i luciferasa, es van posar 3×10^5 cèl·lules/pou en plaques de 9,4 cm² per pou per a créixer durant 24 h, i tenir aproximadament un 60-70% de confluència. Les cèl·lules N2a i SH-SY5Y, després de canviar el medi de cultiu a medi de sèrum reduït Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific), es van transfectar amb 2 µg d'ADN plasmídic mesclats prèviament amb lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) (1,5 µL/µg d'ADN) en medi Opti-MEM durant 20 minuts, per formar liposomes que contenen l'ADN plasmídic i són capaços de fusionar-se amb la membrana plasmídica de les cèl·lules. Seguidament es van incubar les cèl·lules en transfecció durant 4 h a 37 °C, i posteriorment es va canviar el medi de cultiu per medi de diferenciació neuronal que conté Neurobasal (Thermo Fisher Scientific), suplement optimitzat sense sèrum B-27 1X (Thermo Fisher Scientific), 2 mM de L-glutamina (Thermo Fisher Scientific) i es van deixar incubant-se a 37 °C. Les cèl·lules HEK 293 es van transfectar també amb 2 µg d'ADN plasmídic, mesclats durant 10 min a temperatura ambient amb clorur de calci (CaCl₂) 2 M i HBS pH 7,00 que conté 50 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10 mM KCl, 12 mM D-glucosa, 280 mM NaCl i 1,5 mM Na₂PO₄; formant complexos cristal·lins de fosfat de calci amb ADN plasmídic incrustat que són capaços de travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules. Posteriorment, es van incubar les cèl·lules a 37 °C durant 15 h, i després d'un canvi de medi, amb medi DMEM suplementat amb sèrum en van seguir incubant a 37 °C.

Les cèl·lules N2a, SH-SY5Y i HEK 293 es van recollir a les 48 h posttransfecció en tubs d'1,5 mL utilitzant tripsina 0,05% per desadherir-les de la placa de cultiu, i es van rentar amb medi sense sèrum abans de congelar-les amb nitrogen líquid i guardar-les a -80 °C fins al seu ús.

Com a control de transfecció, el plasmidi d'interès es va cotransfectar amb un plasmidi d'ADN que expressa la proteïna verda fluorescent (GFP), per així poder determinar l'eficiència de transfecció qualitativament en un microscopi de fluorescència, i quantitativament amb l'ús d'anticòs específic contra GFP en western-blot.

5.2. Western-blot.

En general, els pellets de cèl·lules congelades i teixits de humans congelats es van homogeneïtzar amb tampó de lisis que contenia Tris-HCl (10 mM, pH 7.4), 2% SDS, 15% glicerol, 50 mM de fluorur de sodi (NaF), 5 mM d'ortovanadat de sodi (NaVO₃), 1 mM d'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) i còctel d'inhibidors de proteases 1X (Complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics), utilitzant un homogeneïtzador automàtic

(Sigma-Aldrich), a temperatura ambient per evitar la precipitació del SDS. Després d'una centrifugació de 15 min a 16.000 g es va recollir el sobrenedant.

La concentració de proteïna es va determinar amb l'assaig colorimètric DC protein assay (Bio-Rad Laboratories) i lectura a 750 nm amb l'espectrofotòmetre Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Entre 10 i 50 µg d'extracte total de proteïna, depenent del tipus cel·lular o teixit, mesclats amb 4X Protein Sample Loading Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) i 0,2 M de DTT, es van separar mitjançant una electroforesi amb gel de poliacrilamida al 15% en condicions desnaturalitzants. A continuació, les proteïnes es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa amb porus de 0,45 µm (PerkinElmer, Waltham, MA) utilitzant l'instrument Trans-Blot *turbo transfer system* (Bio-Rad Laboratories) a 25 V durant 30 min. Posteriorment, es van bloquejar amb un tampó TBS que conté 0,5% de caseïna (Thermo Fisher Scientific) durant 1 h a temperatura ambient. Després, es van incubar anticossos primaris amb volums iguals de TBS-Tween 0,1% i caseïna durant tota la nit a 4 °C o 1 h a temperatura ambient, depenent de l'anticòs (veure **Taula 14**). Després de rentats, es van incubar les membranes amb anticossos secundaris conjugats amb marcador d'infraroig, depenent de l'anticòs primari. Finalment, després de rentats i assecat de la membrana, es va analitzar en el lector infraroig Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) i el programa d'anàlisi Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) (561,562).

Proteïna diana	Hoste i clonalitat	Dilució	Temps i temperatura d'incubació	Proveïdor	Referència
Anticossos primaris					
HA	Ratolí, monoclonal	1:1.000	O/N, 4 °C	Cell Signaling Technology	2367
FXN	Conill policlonal	1:15.000	1 h, RT	Dra. Grazia Izaya (Mayo Clinic, Rochester, MN)	(563)
VDAC1	Conill, monoclonal	1:1.000	1 h, RT	Cell Signaling Technology	D73D12
ATP5H	Conill policlonal	1:1.000	1 h, RT	Sigma-Aldrich	SAB4500107
4-HNE	Conill policlonal	1:1.000	O/N, 4 °C	Abcam	ab46545
SOD1	Conill policlonal	1:3.000	1 h, RT	Enzo Life Sciences	ADI-SOD-100
GAPDH	Conill policlonal	1:20.000	1 h, RT	Sigma-Aldrich	G9545
ACTB	Ratolí, monoclonal	1:15.000	1 h, RT	Sigma-Aldrich	A5441
GFP	Ratolí, monoclonal	1:10.000	1 h, RT	Covance	MMS-118P
Anticossos secundaris					
IRDye 800CW anti-IgG de Ratolí	Ase	1:30.000	1 h, RT	LI-COR Biosciences	926-32212
IRDye 680RD anti-IgG de Conill	Ase	1:30.000	1 h, RT	LI-COR Biosciences	926-68073

Taula 14. Llista d'anticossos primaris i secundaris utilitzats en western-blot. HA, hemaglutinina; FXN, frataxina; VDAC1, canal d'anions depenent de voltatge 1; ATP5H, subunitat d de l'ATP sintasa; 4-HNE, 4-hidroxinonenal; SOD1, superòxid dismutasa 1; GAPDH, gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa; ACTB, beta-actina; GFP, proteïna fluorescent verda; O/N: tota la nit; RT: temperatura ambient.

6. Producció i purificació dels vectors virals recombinants adenoassociats.

Els vectors virals recombinants rAAV9-FXN, rAAV9-LUC i rAAV9-Null es van produir i purificar, en les instal·lacions amb nivell de bioseguretat 2 de la Unitat de Producció de Virus (UPV) de la Universitat Autònoma de Barcelona, dirigida pel Dr. Miguel Chillón.

Primerament, mitjançant tècniques de clonació es va incloure el constructe d'expressió comprès des del promotor fins la seqüència de poliadenilació de l'hormona de creixement bovina (bGH PA) en un plasmidi pAAV, de manera que el constructe d'expressió va quedar flanquejat per dues seqüències repetides terminals invertides (ITR) de 145 pb cadascuna. Els vectors recombinants adenoassociats es van generar utilitzant el mètode de la triple transfecció en 2×10^8 cèl·lules HEK 293 amb 250 µg del plasmidi pAAV generat per clonació que inclou el constructe d'expressió, 250 µg del plasmidi pRepCap, que conté els gens *Cap* i *Rep* dels AAV, i 500 µg del plasmidi pXX6, que conté els gens *Helper* de l'adenovirus essencials per la formació dels virions. Després de 48 h, els AAV es van recollir de les cèl·lules HEK, es van tractar amb benzonasa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya) i es van purificar en un gradient de iodixanol (Axis-Shield Diagnostics, Dundee, Regne Unit). Finalment es va determinar el títol dels AAV obtingut utilitzant el sistema Picogreen (564).

Els AAV9 recombinants es van produir en un títol final de $1,4 \times 10^{13}$ gv/mL pel rAAV9-FXN (rAAV9-hPGK1-kFXN-HA-WPRE), $9,8 \times 10^{12}$ gv/mL pel rAAV9-LUC (rAAV9-hPGK1-LUC-WPRE) i 6×10^{12} gv/mL pel rAAV9-Null (AAV2/9-Null).

7. Administració única intratecal dels vectors virals adenoassociats (rAAV9) en els ratolins.

Ratolins amb 10 setmanes d'edat es van anestesià amb l'administració intraperitoneal de ketamina (10 mg/kg de pes del ratolí; Imalgene 50 mg/mL; Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemanya) i xilazina (1 mg/kg de pes de ratolí; Rompun; Bayer, Leverkusen, Alemanya). L'estat d'anestèsia es va comprovar mitjançant el reflex podal. Quan els ratolins van estar completament anestesiats, es van col·locar en posició prona. Es va afaitar la zona lumbar de la part posterior dels ratolins. Després de desinfectar la zona amb povidona (Kern Pharma, Terrassa, Espanya) es va tallar la pell i el múscul uns 2-3 cm seguint la direcció lumbar-toràcica per deixar al descobert la columna vertebral. La sang es va absorbir amb gases estèrils. Seguidament es van

administrar les partícules virals AAV mitjançant una injecció amb xeringa Hamilton 705RN (Hamilton Company, Reno, NV) amb una agulla del calibre 33G (Hamilton Company) entre les vèrtebres lumbars L3-L4 directament al líquid cefalorraquidi dins de l'espai intratecal de la medul·la espinal. Un reflex del moviment de la cua va indicar que l'agulla es trobava en el lloc correcte. L'administració dels rAAV9 diluïts en PBS/40% de iodixanol es va fer lentament per evitar l'augment de la pressió del cefalorraquidi líquid. La xeringa es va retirar lentament 30 s després de la finalització de l'administració per afavorir la propagació a través del líquid cefalorraquidi i evitar el reflux a la perifèria. Posteriorment, es van cosir els músculs epaxials de la columna vertebral amb sutura absorbible, es va tancar la pell amb clips de sutura Michel (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemanya) i es va aplicar una solució antisèptica a la ferida. Durant el procés d'administració es van mantenir els ratolins a una temperatura corporal de 32 °C amb manta de calor. L'administració de rAAV9 es va realitzar en una cabina de flux laminar de seguretat biològica 2 LabGard ES NU-677 Class II (NuAire). Els ratolins es van retornar a les gàbies i es va monitoritzar la finalització de l'efecte de l'anestèsia i la recuperació postoperatòria de les capacitats motrius i funcionals com la capacitat per alimentar-se o beure. Durant la primera setmana després de la cirurgia, es va aplicar diàriament una solució de iode antisèptic sobre lesions a la pell. Les dues setmanes posteriors a la cirurgia els ratolins van descansar i es van recuperar de la lesió (565).

D'aquesta manera es van administrar els vectors virals adenoassociats recombinants de serotip 9 generats, directament en el LCR travessant mecànicament la barrera hematoencefàlica mitjançant una única injecció en l'espai intratecal en l'espai subaracnoïdal de la zona lumbar de la medul·la espinal. A continuació es detalla el volum, quantitat i dosi de rAAV9 administrats.

rAAV9 generats	Concentració inicial o títol (gv/mL)	Volum administrat (µL)	Número de partícules virals administrades per ratolí (gv)	Número de partícules virals administrades per pes de ratolí (gv/Kg)
rAAV9-FXN	$1,4 \times 10^{13}$	10	$1,4 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{12} - 8 \times 10^{12}$
rAAV9-Null	6×10^{12}	20	$1,2 \times 10^{11}$	$4,5 \times 10^{12} - 8 \times 10^{12}$
rAAV9-LUC	$9,8 \times 10^{12}$	13	$1,27 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{12} - 6,2 \times 10^{12}$

Taula 15. Volum, partícules virals i dosi administrades de cadascun dels vectors virals rAAV9 generats en els ratolins. gv: genomes virals.

8. Bioluminescència *in vivo* i *ex vivo*.

Per adquirir imatges de bioluminescència *in vivo*, els ratolins es van anestesiari amb 2% d'isoflurà i 1 L/min d'oxigen i es van afaitar completament per treure el pelatge negre característic de la soca C57Bl6, a la qual pertanyen els ratolins WT i YG8R utilitzats en aquest estudi, ja que impedeix la correcta detecció fotònica. El substrat D-Luciferina XenoLight (PerkinElmer) es va injectar per via intraperitoneal, a una dosi de 150 mg de D-Luciferina/Kg de pes corporal del ratolí a partir d'un estoc preparat de 15 mg/mL en PBS de Dulbecco (DPBS) 15 minuts abans de realitzar la lectura luminescent. Els ratolins es van col·locar després en la cambra hermètica de l'instrument IVIS lumina II (PerkinElmer) amb anestèsia mantinguda amb un 1% d'isoflurà. Les imatges es van generar amb una càmera refrigerada acoblada al IVIS lumina II (PerkinElmer) i l'anàlisi d'imatges es va realitzar amb el programa Living Image (PerkinElmer). Els temps d'exposició van variar entre 30 segons i 5 minuts, depenent de la intensitat de senyal. Per a cada ratolí, les imatges es van adquirir 15 minuts després de la injecció del substrat. Les imatges resultants mostren el nombre de fotons emesos/segon/cm² (Radiació lumínica) representats en fals color, on el valor fotònic màxim és vermell i el mínim és color blau fosc.

Per a la imatge de bioluminescència *ex vivo*, es van disseccionar els òrgans dels ratolins eutanasiats 10 min després de la injecció intraperitoneal del substrat D-luciferina, i es van rentar amb sèrum salí NaCl 0,9%. Es va adquirir imatges del cervell, cerebel, tronc cerebral, medulla espinal, fetge, cor, pàncrees, pulmons, ronyó, melsa, múscul esquelètic i còlon amb l'instrument IVIS Lumina II. Totes les imatges es van obtenir amb un temps d'exposició de 5 minuts.

9. Avaluació de l'expressió de frataxina recombinant en els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

9.1. PCR quantitativa amb retrotranscripció a temps real (qRT-PCR).

Per avaluar els nivells d'ARNm de frataxina total es van dissenyar encebadors i sonda específics capaços d'amplificar tots els transcrits d'ARNm de frataxina humana i recombinant i així poder comparar els nivells d'ARNm de frataxina dels ratolins YG8R hemizigots, que contenen únicament ARNm de frataxina humana del transgèn (Tg + rAAV9-Null), els ratolins YG8R hemizigots administrats amb el vector rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN), que contenen a més de l'ARNm de frataxina humana del transgèn, l'ARNm de frataxina recombinant del virus; i els ratolins YG8R homozigots (Tg/Tg) com a control d'expressió elevada d'ARNm de frataxina humana del transgèn. Després de realitzar un alineament entre els 4 transcrits descrits d'ARNm de frataxina humana amb el Clustal Omega, es van dissenyar encebadors *forward*, *reverse* i sonda Taqman marcada amb FAM en les zones compartides entre els exons 3 i 4, amb una mida

d'amplificó de 139 pb. Es va comprovar mitjançant BLAST que aquests encebadors i sonda amplificaven únicament els transcrits de *FXN*, del total del transcriptoma del ratolí, evitant la possible generació d'amplicons inespecífics.

L'ARN total es va aïllar de teixits congelats de ratolí amb el kit de purificació d'ARN RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) seguint les indicacions del fabricant. (veure apartat 2.2.1 de materials i mètodes). Els teixits que es van analitzar van ser els ganglis de les arrels dorsals (DRG) lumbar; la medulla espinal lumbar, toràcica i cervical; el tronc cerebral; el cerebel; el còrtex frontal del cervell; el fetge; el cor; i el pàncreas de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN, Tg/Tg als 7 mesos d'edat. (N=5 individus per grup, 3 femelles i 2 mascles). Un cop extret l'ARN total, es va sintetitzar l'ADNc amb el kit PrimeScript™ RT reagent (Takara Bio), que conté l'enzim retrotranscriptasa PrimeScript RTase per passar l'ARNm a ADN complementari. 200 ng d'ARN total es van mesclar amb el buffer PrimeScript 1X, PrimeScript RT Enzyme Mix I, 25 pmol Oligo dT Primer, 50 pmol de Random 6 mers en un volum final de 10 µL i es van incubar en el termociclador a 37 °C durant 15 min realitzant la retrotranscripció, i 85 °C durant 5 s per inactivar per calor l'enzim retrotranscriptasa.

Els nivells d'ARNm de frataxina total es van quantificar per qRT-PCR en temps real en el termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics) en una reacció en placa de 96 pous amb volum final de 10 µL, que contenia 10 ng de ADNc, els encebadors a una concentració final de 900 nM cadascun i 250 nM de sonda, i la TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG 1X (Thermo Fisher Scientific). Es van seguir les condicions de termociclador d'un cicle de 95 °C durant 10 minuts i 40 cicles de 95 °C durant 15 segons, 60 °C durant 1 minut. L'anàlisi de la quantificació relativa es va fer mitjançant el mètode comparatiu Ct ($\Delta\Delta Ct$). Com a control intern d'expressió endògena de ratolí, es van normalitzar els valors de qRT-PCR obtinguts de l'expressió d'ARNm de frataxina total amb els d'expressió d'ARNm de beta 2-microglobulina (*B2m*) (Mm.PT.39a.22214835, Integrated DNA Technologies) per a tots els teixits excepte el pàncreas, que es va utilitzar el *Gapdh* com a control intern, donat que el *B2m* és inestable en aquest teixit. Es van realitzar triplicats de cada mostra pel gen d'interès i el gen control.

Per a la detecció únicament d'ARNm de frataxina recombinant del vector viral rAAV9-FXN es va realitzar també mitjançant qRT-PCR amb la mateixa reacció i condicions de termociclador, però utilitzant encebadors i sonda dissenyats específicament per amplificar únicament una regió de l'ARNm de frataxina recombinant (*rFXN*). Concretament l'encebador *forward* i la sonda es van dissenyar en l'exó 5 de la frataxina humana, i el *reverse* en la seqüència de l'etiqueta hemaglutinina (HA) únicament present en l'ARNm de frataxina recombinant, amplificant un fragment de 161 pb.

Gen	Nom de l'encebador	Seqüència nucleotídica (5' – 3')	Mida (pb)	Ta (°C)	Lloc d'unió	Amplicó (pb)
<i>FXN</i> <i>Fxn</i>	hFXN + mFxn_Fw	TTGAAGACCTTGCAGACAAG	20	55,9	Exó 3	
	hFXN + mFxn_Sonda-FAM	AGGAACCTACGTGATCAACAAGCAGAC	27	57,1	Exó 4a	139
	hFXN & mFxn_Rv	AGCCAGATTTGCTTGTGG	20	57,2	Exó 4a	
<i>B2m</i>	B2m_cDNA_Fw	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	20	58	Exó 1	
	B2m_cDNA_Sonda-FAM	CCGGAGAATGGGAAGCCGAACATAC	25	65,4	Exó 2	136
	B2m_cDNA_Rv	GGGTGGAAGTGTGTACGTAG	21	58,3	Exó 2	
<i>Gapdh</i>	Gapdh_cDNA_Fw	ACCACAGTCCATGCCATCAC	20	60,3	Exó 4-5	
	Gapdh_cDNA_Sonda-FAM	CCTCTGGAAAGCTGTGGCGTGAT	23	59,2	Exó 5	106
	Gapdh_cDNA_Rv	TGGATGCAGGGATGATGTCT	21	59,2	Exó 5	
<i>rFXN</i>	FXN_cDNA_Ex5a_Fw	TTATGACTGGACTGGGAAAAACTG	24	58,9	Exó 5a	
	rFXN-HA_Sonda-FAM	AACTGGACTGTCTTCCTTGGCCT	24	57,9	Exó 5a	161
	HA_Rv	CATAGTCTGGGACGTCATATGGAT	24	59,5	HA	

Taula 16. Llista d'encebadors i sondes utilitzats per la quantificació d'ARNm per qRT-PCR en teixits de ratolins de 7 mesos d'edat. Ta, indica la temperatura d'anellament; Fw, *forward*; Rv, *reverse*; FAM, amidada de fluoresceïna, *FXN*, frataxina humana; *Fxn*, frataxina murina; *B2m*, beta-2-microglobulina de ratolí; *Gapdh*, gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de ratolí; *rFXN*, frataxina recombinant; *HA*, hemaglutinina.

9.2. Western-blot de teixits de ratolí.

50 mg de teixits congelats a -80 °C es van homogeneïtzar amb un tampó de lisi que contenia Tris-HCl (10 mM, pH 7.4), 2% SDS, 15% glicerol, 50 mM de fluorur de sodi (NaF), 5 mM d'ortovanadat de sodi (NaVO₃), 1mM d'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) i còctel d'inhibidors de proteases 1X (Complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics). Es va utilitzar un homogeneïtzador manual Kimble Kontes *Dounce tissue grinder* (Thermo Fisher Scientific) per a tots els teixits excepte pels DRG, que degut a la seva petita mida i pes, es van homogeneïtzar amb un homogeneïtzador automàtic (Sigma-Aldrich). El volum de tampó de lisi utilitzat es va calcular en funció del pes, mida i característiques de cada teixit, en general es van utilitzar 3 mL de tampó de lisi per cada gram de teixit, però es va ajustar a 2 mL/g aproximadament, sobretot pels teixits del sistema nerviós com la medul·la espinal i els DRG. Els teixits homogeneïtzats es van sonicar per fragmentar l'ADN i restes de membranes. Posteriorment, es van centrifugar a 16.000 g durant 15 min. Els teixits del sistema nerviós com els DRG, medul·la espinal, tronc cerebral, nervi ciàtic, cervell van requerir d'una segona centrifugació a 16.000 g durant 5 min per eliminar la mielina insoluble. Es va recollir el sobrenedant en ambdós centrifugacions.

Per a tots els teixits es va carregar 50 µg d'extracte de proteïna en els gels de poliacrilamida per realitzar l'electroforesi desnaturant, excepte pels DRG que se'n va carregar 20 µg, degut a la inferior quantitat de proteïna que s'extreu d'aquest teixit. El procediment continua tal com està

detallat en l'apartat 5.2 de materials i mètodes. Els anticossos que es van utilitzar estan descrits en la **Taula 14** de l'apartat 5.2 de materials i mètodes.

10. Tests de neurocomportament per a l'avaluació fenotípica dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

Per avaluar l'eficiència del tractament rAAV9-FXN es va realitzar una sèrie de tests de neurocomportament en els ratolins, similars als que es realitzen per monitoritzar els pacients amb FRDA. Per tant, es van comparar els ratolins transgènics hemizigots YG8R administrats amb el tractament rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN), amb els ratolins transgènics hemizigots YG8R administrats de la mateixa manera amb el vector rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) i els ratolins salvatges WT administrats amb el vector viral rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) com a control de fenotip no patològic.

Es va establir en 10 el número de ratolins mínim de cada grup per obtenir uns resultats sòlids i extreure conclusions estadísticament significatives, dels quals 5 són femelles i 5 són mascles. En general, com s'especifica en la descripció de cada test de comportament individualment, és realitzen mesures de manera continuada per cadascun dels ratolins per així fer un seguiment de la progressió dels signes de la malaltia i també del tractament rAAV9-FXN en el temps, des de la seva administració en els ratolins a les 10 setmanes d'edat fins als 14 mesos d'edat, tenint resultats amb un any de tractament.

10.1. Electrofisiologia del nervi caudal.

Els estudis de conducció nerviosa sensorial es van realitzar en el nervi caudal de la cua dels ratolins amb el sistema de monitorització portàtil EMG/PE N-EP de dos canals Medelec Synergy (Oxford instruments, Abingdon, Regne Unit). Els ratolins es van anestesiari amb 4% isoflurà i oxigen 1L/min i es van mantenir anestesiats en posició prona, a 32 °C amb 2% isoflurà fins finalitzar la mesura. Es va estimular amb un pols elèctric el nervi caudal mitjançant la col·locació d'elèctrodes subcutanis a 1 cm de la punta de la cua (Punt d'estimulació) i a 6 cm de la punta de la cua (Punt de registre), essent la distància de mesura del nervi entre el punt d'estimulació i el punt de registre de 5 cm (**Figura 12B**). Un altre elèctrode es va col·locar com a toma terra per eliminar el soroll de fons. L'estímul elèctric del nervi es va fer amb una durada de 0,05 ms, a una intensitat de voltatge supramàxim de 50V i es va enregistrar una mitjana de 30 lectures seguides per reduir la variabilitat. Es va registrar el potencial d'acció sensitiu del nervi caudal de la cua a partir del qual es va mesurar l'amplitud (μV). L'amplitud és defineix com la intensitat d'estimulació del nervi, mesurada des de l'aparició del potencial d'acció fins al pic màxim

d'intensitat del potencial d'acció, i correlaciona amb el número d'axons que conté el nervi (Figura 12C).

Els registres de conducció nerviosa es van realitzar als 4, 6, 9, 11 i 13 mesos d'edat del ratolí. Es van analitzar els ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN, amb una N de 10 ratolins per grup, 5 femelles i 5 mascles.

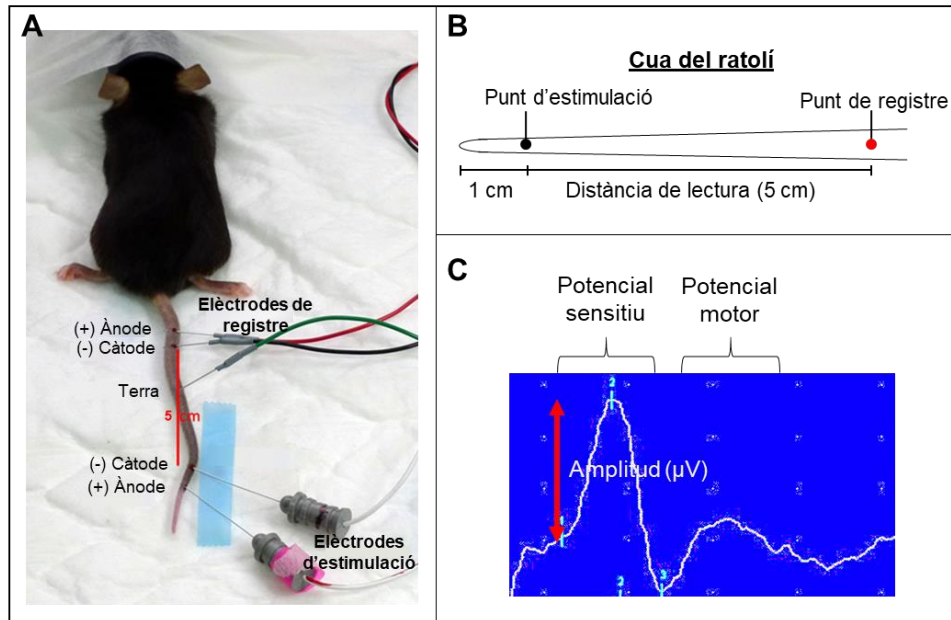


Figura 12. Metodologia utilitzada per la mesura electrofisiològica en el nervi caudal de la cua dels ratolins. **A)** Exemple de mesura electrofisiològica on es representa la col·locació dels elèctrodes (càtode i ànode) tant d'estimulació com de registre en la cua del ratolí. **B)** Representació esquemàtica de la cua de ratolí amb els punt d'estimulació i registre, i les distàncies que es van fixar per l'enregistrament del potencial d'acció sensitiva. **C)** Exemple de lectura que s'obté en cada mesura electrofisiològica. D'esquerra a dreta, després de l'estímul apareix primer el potencial sensitiu, seguit del potencial motor. La fletxa en vermell indica l'amplitud del potencial d'acció sensitiva que es mesura.

10.2. Test del rotarod accelerat.

La coordinació motora i l'aprenentatge d'habilitats motores dels ratolins es van avaluar amb l'instrument Rotarod/RS (Harvard apparatus, Holliston, MA). L'instrument consta d'una barra cilíndrica de 3 cm de diàmetre i 30 cm de llarg, separada cada 6 cm aproximadament per una paret per separar els ratolins, permetent l'anàlisi simultani de 4 ratolins; i un motor elèctric que fa girar la barra (Figura 13). Els ratolins es van col·locar sobre la barra i aquesta va accelerar la velocitat de rotació gradualment de 0 a 40 rpm durant 5 minuts. Es va registrar automàticament el temps que tarden els ratolins en caure de la barra (latència de caiguda), en un temps màxim de 5 min. Es va realitzar 4 assajos cada dia durant un període de 5 dies per determinar no només la funció motora, sinó també l'aprenentatge motor. Cada ratolí es va deixar reposar durant 5 min entre

assajos (566). edat en els mateixos ratolins per tal de monitoritzar la coordinació i l'aprenentatge motor al llarg del temps.

Els assajos es van realitzar amb els mateixos ratolins als 3, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 mesos d'edat dels ratolins. Es van analitzar ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN, amb una N de 10 ratolins per grup, 5 femelles i 5 mascles.



Figura 13. Instrument rotarod utilitzat per a l'avaluació de la coordinació i aprenentatge motor dels ratolins.

10.3. Reflex d'agafada (hindlimb clasping reflex).

Els ratolins es van agafar per la cua durant 10 segons i es va registrar la posició de les dos potes posteriors. Es va assignar un valor de 0 a 3, on 0 es va definir com un fenotip no patològic i 3 el fenotip patològic més sever. Els ratolins amb un reflex d'agafada normal tenien les dos potes posteriors estirades obertament cap a fora de l'abdomen per intentar agafar-se a algun objecte, aquesta posició es va considerar no patològica i se li va assignar un valor 0. Quan tenien una pota parcialment retreta, pegada a l'abdomen, el valor va ser 1. Quan les dos potes estaven parcialment retretes més del 50% del temps, el valor va ser 2. Finalment, es va assignar un valor 3 quan ambdues potes inferiors estaven completament retretes tocant l'abdomen més del 50% del temps.

El reflex d'agafada es va analitzar en els mateixos ratolins als 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 mesos d'edat dels ratolins. Es van analitzar ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN, amb una N de 12 ratolins per grup, 6 femelles i 6 mascles.

10.4. Anàlisi de la petjada (*footprint analysis*).

Per registrar les petjades dels ratolins, es van submergir les potes en pintura no tòxica (Creative Deco), blau per les potes anteriors i vermell per les potes posteriors. Es van fer caminar els ratolins per un passadís de 40 cm de llarg per 8 cm d'ample delimitat amb parets laterals de 7 cm d'alçada i una cartolina negra per sobre tapant el passadís. Es va col·locar una llum de 60 W al començament del passadís i una caixa negra al final com a estímul per facilitar que el ratolí vagi

en la direcció correcta donada la seva tendència a escapar de la llum i anar cap a la foscor. El passadís té a sota una fulla de paper blanca per tal que les petjades quedin pintades i es puguin discernir amb facilitat. Tots els ratolins van realitzar dos entrenaments per acostumar-los a passar per la passarel·la, abans de realitzar l'assaig final i obtenir les petjades. Es va mesurar la llargada de cada passa per les potes esquerra i dreta posteriors i anteriors separatament, l'amplada base entre les potes dreta i esquerra tant posteriors com anteriors; la distància de solapament entre les potes posteriors i anteriors per cada passa, i la distància en diagonal de les potes posteriors dreta i esquerra. Per cada ratolí es va mesurar tres passes de la part mitja de la fulla on s'ha enregistrat. El test de la petjada es va realitzar en ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 12 mesos d'edat, amb una N de 10 ratolins per grup, 5 femelles i 5 mascles.

10.5. Determinació del pes.

Es va fer un seguiment del pes de tots els ratolins dels grups WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN cada mes, des dels 2 fins als 14 mesos d'edat amb una balança de precisió (Harvard Apparatus).

11. Dissecció i obtenció dels teixits dels ratolins.

Els ratolins es van anestesiari amb isoflurà 4% i oxigen 1 L/min i seguidament es van mantenir amb anestèsia amb isoflurà al 2% en posició supina. Es va obrir el ratolí pel tòrax deixant el cor al descobert i es va perfondre intracardíacament el ventricle esquerra amb 50 mL de sèrum salí (NaCl 0,9%) per tal de dessagnar el ratolí i així eliminar la sang dels teixits. Ràpidament, es va disseccionar el pàncreas, cor, fetge, en aquest ordre, com a teixits sistèmics. Seguidament, es va disseccionar cervell, cerebel i tronc cerebral junts. A continuació, es va extreure el nervi ciàtic. Es va aïllar la columna vertebral d'on es va extreure la medul·la espinal per extrusió hidràulica amb sèrum salí mitjançant una xeringa amb agulla 18 G. Després es va obrir la columna vertebral longitudinalment, per extreure els DRG individualment amb pinces i l'ajuda d'una lupa de dissecció. Tant la medul·la espinal com els DRG es van dividir en cervicals, toràcics i lumbar. El procés d'extracció de la medul·la espinal i els DRG es va realitzar sobre gel per evitar la degradació i mort de les cèl·lules del teixit, així com del seu contingut biològic d'interès com les proteïnes, ARN i ADN.

Un cop extrets els teixits, en general es van separar en tubs d'1,5 mL i aquests es van congelar instantàniament amb nitrogen líquid per evitar la degradació i mort cel·lular. Posteriorment, es van guardar a -80 °C. D'aquesta manera els teixits es van utilitzar per a estudis de quantificació d'ARNm, de quantificació de proteïna a través de western-blot i assajos bioquímics com la caracterització de la funció mitocondrial.

Els teixits que es van avaluar amb tècniques d'histologia i immunohistoquímica, immediatament després de la seva extracció es van posar en una solució fixadora amb 4% paraformaldehid (PFA) en tampó fosfat salí (PBS) pH 7,4 per preservar les seves característiques morfològiques i moleculars. Es van guardar a 4 °C durant 12-18 h per facilitar que la solució fixadora penetrés per tot el teixit.

Per avaluar la ultraestructura i morfologia dels teixits mitjançant microscòpia electrònica, els ratolins es van perfondre intracardíacament amb 50 mL d'una solució fixadora temperada que contenia 4% PFA i 5% glutaraldehid en 0,1 M de PBS a pH 7,4. Posteriorment, els teixits es van disseccionar i es van guardar a 4 °C amb la mateixa solució fixadora.

El pàncreas va ser el primer teixit en extreure's. El fragment que es va destinar per a la quantificació d'ARNm es va submergir immediatament en una solució estabilitzadora d'ARN, RNAlater Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific), perquè és un teixit que particularment conté moltes ribonucleases, que ràpidament degraden l'ARNm i per tant inhabiliten l'ús del teixit per a estudis posteriors de quantificació d'ARN. Es va deixar el teixit en *RNA later* tota la nit a 4 °C per a que el reactiu penetrés bé per tot el teixit i després es va congelar a -80 °C fins al seu ús. La resta de teixits destinats a la quantificació d'ARN, es van poder processar a partir de teixit congelat sense veure's afectada la integritat de l'ARN.

12. Avaluació de la neuropatologia dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

12.1. Histologia.

Per a l'anàlisi histològic, els teixits extrets dels ratolins i posteriorment fixats amb paraformaldehid 4% tal com s'ha explicat en l'apartat anterior, després d'un procés de deshidratació amb alcohols a concentracions creixents, es van incloure en parafina i es van tallar en seccions a un gruix de 5 µm amb el micròtom RM2255 (Leica). El cervell, el cerebel i el tronc cerebral, que es van extreure junts, i el cor es van tallar sagitalment. En canvi, les seccions de medul·la espinal cervical, toràcica i lumbar es van tallar coronalment. Finalment, les seccions es van recollir en portaobjectes.

Es van analitzar seccions de teixits de ratolins dels grups WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat, és a dir, als 12 mesos després de l'administració dels rAAV9. En general amb una N de 4 ratolins per grup, dels quals 2 eren femelles i 2 eren mascles. La visualització i obtenció de les imatges microscòpiques de les seccions de teixit tenyides es van realitzar amb el microscopi òptic invertit Axioskop 2 (Zeiss), i el posterior processat i anàlisi

d'imatges amb el programa ZEN 2 (*Blue edition*) v2.0 (Zeiss) i ImageJ v1.52p (NIH, Bethesda, MD), respectivament.

12.1.1. Tinció hematoxilina & eosina (H&E).

Seccions de teixit de DRG i cor es van desparafinar i rehidratar amb un gradient d'alcohols de concentració decreixent. Seguidament, es va fer la tinció hematoxilina i eosina. Primer es va incubar amb hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) durant 1 minut, i després de rentats amb aigua, es va submergir 2 cops en etanol al 70% amb àcid clorhídric (1/100). A continuació, després de rentats, es va incubar amb amoni aquós al 0,2%, es va tornar a rentar i es va incubar en etanol 96% durant 30 segons. Finalment, es va contratenyir amb eosina Y (Sigma-Aldrich). Les seccions es van deshidratar amb un gradient d'alcohols i es van muntar amb un cobreobjectes i medi de muntatge DPX (Thermo Fisher Scientific). El resultat de la tinció amb hematoxilina va ser la coloració lila dels nuclis de les cèl·lules, ja que tenyeix substàncies àcides, principalment l'ADN concentrat en el nucli. Amb l'eosina els resultat és una tinció rosada de les estructures bàsiques com el citoplasma i la matriu extracel·lular de la cèl·lula. Es va analitzar la neurodegeneració de les neurones sensibles dels DRG mesurant la densitat neuronal, la mida, i la presència de vacuoles i picnosis en els nuclis de les imatges obtingudes de les seccions tenyides per microscòpia amb el programa ImageJ (NIH). De la mateixa manera, es va avaluar la hipertròfia cardíaca mesurant el grossor de la paret del ventricle esquerra i del septe ventricular.

12.1.2. Tinció Nissl.

La tinció de Nissl es va utilitzar per avaluar l'estructura i morfologia de la medul·la espinal lumbar i el cerebel. Les seccions de teixit es van desparafinar i rehidratar amb un gradient d'alcohols de concentració decreixent i seguidament es van incubar durant 20 minuts a temperatura ambient en una solució d'acetat de violeta al 0,1% (Sigma-Aldrich), preparada en aigua destil·lada i amb 0,25% del volum d'àcid acètic glacial. Finalment, després de rentats, les seccions es van deshidratar i es van muntar en medi DPX (Thermo Fisher Scientific). El resultat va ser la tinció en color blau del citoplasma de les neurones.

12.1.3. Tinció de Perls.

Per analitzar l'acumulació de ferro en el teixit cardíac dels ratolins, primer es van desparafinar i rehidratar els talls de teixit. Seguidament, es van incubar les seccions durant 20 min a temperatura ambient amb una mescla a parts iguals d'àcid clorhídric (HCl) al 5% i ferrocianur de potassi (Merck, Darmstadt, Alemanya) al 5%. A continuació, després de 3 rentats amb aigua destil·lada, es va realitzar una contratinció amb roig nuclear (Vector laboratories, Burlingame, CA) durant 5 minuts. El resultat de la tinció de Perls va ser una coloració en blau, que mostra l'acumulació de

dipòsits de ferro, degut a la formació de ferrocianur fèrric a partir de la reacció del ferrocianur potàssic amb el ferro acumulat, és a dir, l'ió fèrric (Fe^{3+}) que s'allibera en condicions àcides degut a l'acció de l'àcid clorhídric.

12.1.4. Immunohistoquímica.

Es va estudiar la biodistribució dels vectors rAAV9-FXN i l'expressió de frataxina recombinant a nivell cel·lular en seccions de DRG de ratolí, mitjançant immunohistoquímica, a través de la reacció immunològica de l'anticòs primari específic contra l'hemaglutinina, adherida únicament en la frataxina recombinant, i l'anticòs secundari marcat indirectament a través del complex avidina-biotina (ABC) amb l'enzim peroxidasa de rave (HRP) que en presència del substrat proporciona una coloració marronosa.

Les seccions de DRG es van desparafinar, hidratar i es van permeabilitzar en PBS-Tritó 0,1% durant 30 minuts. Per al desemascament de l'antigen es van escalfar les seccions en tampó de citrat 1X a pH 6,0 (Thermo Fisher Scientific) a 95°C durant 10 minuts. A continuació es van deixar refredar a temperatura ambient durant 30 min. Per bloquejar el teixit i impedir la unió inespecífica dels anticòs, es van incubar les seccions de teixit amb tampó de bloqueig SuperBlock (PBS) (Thermo Fisher Scientific) durant 1 h a temperatura ambient. Seguidament, les seccions de DRG es van incubar amb l'anticòs primari específic anti-HA (MMS-101P, 1:1.500; Covance, Princeton, NJ), diluït amb el mateix tampó de bloqueig Lab Vision™ Antibody Diluent OP Quanto (Thermo Fisher Scientific), durant tota la nit a 4 °C. A continuació, les seccions es van rentar amb PBS-tritó al 0,1% i es van incubar durant 45 minuts a temperatura ambient amb l'anticòs secundari biotinitat de cavall anti-IgG de ratolí (BA-2000, 1:600; Vector Laboratories) i amb el mateix tampó de bloqueig utilitzat anteriorment. L'acció de les peroxidases endògenes del teixit es va suprimir incubant les seccions amb peròxid d'hidrogen al 3% en PBS durant 30 minuts. Seguidament, les seccions es van incubar durant 30 min amb Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Standard Staining Kit (Thermo Fisher Scientific), continent del complex avidina-biotina amb la peroxidasa, i després de rentats amb Tween al 0,1% en PBS es van incubar 30 minuts amb el substrat 3,3'-diaminobenzidina (DAB) i tampó estable pel substrat peròxid. Posteriorment, es van rentar les seccions amb aigua i es van incubar 5 min amb un potenciador de DAB (Agilent Technologies). Finalment, les seccions es van deshidratar, aclarir i es van muntar amb DPX (Thermo Fisher Scientific) (567). La visualització i obtenció de les imatges microscòpiques del teixit es van realitzar amb el microscopi òptic invertit Axioskop 2 (Zeiss), i el posterior processat d'imatges i anàlisi amb els programes ZEN 2 (*Blue edition*) v2.0 (Zeiss) i ImageJ v1.52p (NIH).

12.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).

Ratolins de 14 mesos d'edat es van anestesià amb isoflurà, i es van perfondre intracardíacament amb una solució fixadora que conté 4% PFA i 5% glutaraldehid en 0,1 M de PBS a pH 7,4 i a temperatura ambient per aconseguir la fixació dels teixits. Es van disseccionar les arrels dorsals dels DRG dels ratolins i es van guardar en la mateixa solució fixadora a 4 °C. Seguidament, es van post-fixar en un tampó fosfat salí amb 1% de tetraòxid d'osmi que contenia 0,8% de $KFeCN_2$, i es va deshidratar mitjançant un gradient d'etanols. Després es van rentar els teixits amb òxid de propilè i es van incloure en resina Medcast (Ted Pella, Tustin, CA). Es van tallar seccions ultrafines i es van tenyir amb acetat d'uranil i citrat de plom. Les seccions tenyides es van examinar en un microscopi electrònic de transmissió JEM 1010 de 100 kV (JEOL) amb càmera CCD Megaview 1kx1k. Les imatges obtingudes van permetre mesurar la mida dels axons de les arrels dorsals dels DRG i l'àrea de mielina que els envolta amb el programa ImageJ v1.52p (NIH).

13. Anàlisi de la funció mitocondrial de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

13.1. Aïllament de la fracció mitocondrial.

Es va homogeneïtzar teixit de ratolí congelat amb un tampó hipotònic de sucrosa que contenia 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 2mM EGTA, 5 mM NaF i còctel d'inhibidors de proteases (Roche Diagnostics) a una proporció de 0,1 mg de teixit/ μ L de tampó i incubat en gel durant 15 min. Seguidament es va afegir 320 mM de sucrosa i es va centrifugar durant 10 min a 900 g. A continuació es va separar el sobrenedant i es va centrifugar durant 10 min a 5000 g. El pellet resultant, que conté la fracció mitocondrial aïllada, es va resuspendre en PBS pH 7,4. La concentració proteica d'aquesta fracció es va quantificar utilitzant el kit DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

13.2. Assaig d'activitat dels complexos I i II de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria.

Els assajos d'activitat dels complexos I i II de la cadena transportadora d'electrons es van realitzar en plaques de 384 pous #3769 (Corning, Corning, NY) en una reacció amb 30 μ L de volum final per pou a partir de la fracció mitocondrial aïllada mitjançant la determinació de l'absorbància per espectrofotometria en el lector Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) tal com s'havia determinat prèviament (561).

Per al complex I (Ubiquinona reductasa, EC 7.1.1.2) es van afegir 5 μ g de fracció mitocondrial aïllada a cada pou en una placa de 384 pous seguit de 100 μ M de 2,6-diclorofenol indofenol

(DCIP) (Sigma-Aldrich). Després de 3 minuts, es va afegir 200 μM NADH (Sigma-Aldrich). Es va monitoritzar la reducció del substrat DCIP a 600 nm durant 30 min i realitzant una lectura cada minut en el lector Varioskan Flash.

Per al complex II (Succinat deshidrogenasa, EC 1.3.5.1), inicialment es van afegir 10 μg de fracció mitocondrial aïllada a cada pou en una placa de 384 pous, 250 μM de Na-azida (Sigma-Aldrich) i 3 min després 100 μM de DCIP. Finalment al cap d'1 min es va addicionar 40 mM de succinat de sodi (Sigma-Aldrich). La reducció de DCIP es va monitoritzar a 600 nm durant 60 min, realitzant una lectura cada minut en el lector Varioskan Flash.

Per cada mostra es van fer triplicats. Es va incloure un control negatiu de la reacció que contenia els reactius substrat sense la mostra proteica per saber els valors residuals d'absorbància que proporcionen els reactius.

Per al càlcul de les activitats dels complexos I i II (nmol/min/mg) es va aplicar la fórmula:

Activitat enzimàtica ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) = $(\Delta \text{ Absorbància/min} \times 1.000) / [(\text{coeficient extinció} \times \text{volum de mostra utilitzada en mL}) \times (\text{Concentració de proteïna de la mostra en mg mL}^{-1})]$. El canvi d'absorbància es va calcular entre dos punts dins de la regió lineal. El coeficient d'extinció del DCIP reduït és ($E^{\text{mm}} = 36,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i el volum de mostra per pou va ser 0,03 mL (561).

13.3. Determinació dels nivells d'ATP basals.

Els nivells basals d'ATP es van determinar a partir d'extracte proteic de teixit total lisat amb medi hipotònic de ratolins de 14 mesos mitjançant el kit de luminescència ATPlite-TM 1step (PerkinElmer) seguint les instruccions del fabricant. El medi hipotònic contenia 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1% de tritó i còctel d'inhibidors de proteases (Roche Diagnostics). Després de la homogeneïtzació es va centrifugar a 16.000 g durant 10 min a 4 °C i se'n va separar el sobrenedant. La concentració proteica d'aquesta fracció es va quantificar utilitzant el kit DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

A 12 μL d'extracte proteic de teixit (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se li va afegir 12 μL de substrat ATP, en un total de 24 μL de volum final de reacció per pou en plaques de 384 pous #3769 (Corning). Per mesurar els nivells d'ATP es va fer una recta patró amb dilucions seriades de 0 a 0,1 nM de concentració de l'estàndard ATP (PerkinElmer). Els valors de luminescència es van determinar en el lector d'espectrofotometria Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Cada mostra es va analitzar per triplicat. Es va incloure com a blanc, medi hipotònic amb substrat ATP.

13.4. Avaluació de l'estrès oxidatiu.

Es va avaluar l'estrès oxidatiu mitjançant la quantificació dels nivells de proteïnes per western-blot a partir d'extracte total proteic de teixit congelat de DRG lumbar i medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat. Es va utilitzar anticossos específics contra la proteïna superòxid dismutasa 1 (SOD1), enzim involucrat en estrès oxidatiu i l'apoptosi, que s'encarrega d'eliminar l'ió superòxid; i amb l'anticòs contra 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producte aldehydic format per l'oxidació dels àcids grassos degut a la peroxidació lipídica que es troba incrementada en condicions d'estrès oxidatiu. El procediment de western-blot seguit està explicat en l'apartat 9.2 de materials i mètodes. Els anticossos que es van utilitzar estan descrits en la **Taula 14** de l'apartat 5.2 de materials i mètodes (pàg. 91).

14. Estadística.

Les dades estadístiques es van analitzar amb el programa IBM SPSS statistics 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY). Primerament es va obtenir la distribució normal i es va mirar la homogeneïtat de les variàncies mitjançant el test de Levene. Les dades amb distribució normal es van analitzar mitjançant el test ANOVA unidireccional seguit per comparacions múltiples post-hoc amb el test Tukey HSD (de l'anglès, *Honestly Significant Difference test*) per a grups de dades amb variàncies igual, o alternativament, amb el test Games-Howell en anàlisi d'ANOVA quan no s'assumeixen les variàncies iguals. Aquells valors que no van complir cap dels dos supòsits es van testar individualment amb el test no paramètric Mann-Whitney U, per demostrar variacions significatives entre dos grups. La significança estadística es va definir amb una $P < 0,05$ (561).

RESULTATS

Capítol I: Caracterització genètica i molecular de l'atàxia de Friedreich.

1. Caracterització del gen *FXN* i la proteïna frataxina.

Hi ha molts aspectes de l'atàxia de Friedreich que ja es coneixen, però n'hi ha alguns que actualment encara no s'han pogut elucidar de manera rotunda o que generen discrepàncies dins la comunitat científica com la funció exacta de la proteïna frataxina, la causa del silenciament transcripcional degut a l'expansió en homozigosi del triplet GAA en l'intró 1 del gen *FXN*, la regulació del gen, la caracterització de la regió promotora, entre altres. En l'inici d'aquest estudi, amb l'objectiu de dissenyar una teràpia gènica eficient per tractar l'atàxia de Friedreich, es va fer una caracterització del gen *FXN* i proteïna frataxina a nivell bioinformàtic per tal d'elucidar algun d'aquests aspectes com conèixer millor la regulació del gen i les causes que condueixen al dèficit d'expressió de la proteïna frataxina en l'atàxia de Friedreich, i així poder utilitzar-los i tenir-los en compte de cara al disseny de la teràpia gènica.

1.1. Estudi de l'evolució filogenètica del gen *FXN* i la proteïna frataxina.

En general les regions d'aminoàcids i d'ADN més conservades evolutivament desenvolupen sovint funcions comunes i importants en els diferents organismes, i que per tant són necessàries de conèixer i estudiar, per entendre la funció i regulació dels gens i les proteïnes. Com ja s'ha explicat en l'apartat 9 de la introducció, es coneix que la proteïna frataxina està força conservada evolutivament, essent semblant a la proteïna homòloga de *E. coli* i llevat, un organisme procariota i eucariota unicel·lular respectivament. Malgrat això, en l'actualitat la regulació del gen no està completament caracteritzada.

Inicialment en aquest estudi, per tal d'identificar aquelles zones que potencialment podien ser importants en la regulació i l'expressió del gen *FXN*, es va fer un estudi de conservació evolutiva de la proteïna frataxina i regions concretes del gen *FXN* mitjançant alineaments de seqüències de forma separada. Es va calcular el percentatge d'identitat de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna frataxina, de la seqüència de nucleòtids codificant, de l'intró 1, de 5 kb de la regió potencialment promotora i de la regió no codificant 3'UTR del gen *FXN*, comparant la conservació d'aquestes seqüències en diferents espècies de famílies, ordres i classes diverses respecte les de *Homo sapiens* (**Figura 14**).

Es va seleccionar l'intró 1 del gen *FXN* perquè és la regió on es trobava la mutació més comuna causant de la malaltia, l'expansió del triplet de repeticions GAA, i perquè es van descriure llocs d'unió de factors de transcripció que podien participar en la regulació del gen (114,122). Les 5 kb de la regió immediatament a 5' del codó d'inici del gen *FXN* es van descriure com a possible seqüència promotora del gen (121). La regió 3'UTR, que correspon a la seqüència d'ADN de l'exó 5a, que es transcriu a ARNm, però no és codificant, podia intervenir en l'estabilitat dels

transcrits i participar en la regulació del gen *FXN* ja que s'havia descrit la unió de microARNs en aquesta regió (568,569).

Per poder fer la comparació evolutiva de les possibles zones reguladores del gen *FXN*, es van seleccionar espècies representants de totes les classes d'animals vertebrats, és a dir de peixos, amfibis, rèptils, aus i mamífers, descartant els animals invertebrats, perquè són més diferents evolutivament als humans. Cada espècie es va classificar per grups filogenètics ordenats evolutivament, i el número de representants de cada classificació es va augmentar a mesura que s'incrementava la proximitat evolutiva als humans, essent els mamífers, els primats i els homínids; la classe, l'ordre i la família amb més espècies representants.

Classificació filogenètica			Espècies	Identitat amb la seqüència humana (%)					
Classe	Ordre	Família		Proteïna	CDS	Intró 1	5 kb Prom	3' UTR	
Mamífers	Primats	Homínids (Simis)	Humà (<i>Homo sapiens</i>)	100	100	100	100	100	
			Ximpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	98,57	98,1	98,89	99,2	98,99	
			Goril·la (<i>Gorilla gorilla</i>)	98,57	98,42	97,39	98,33	98,53	
			Orangutan (<i>Pongo abelii</i>)	95,71	96,68	96,56	96,67	96,67	
		Homínids (Gibons)	Gibó (<i>Nomascus leucogenys</i>)	88,07	96,05	91,76	75,4	-	
			Còlob angoleny (<i>Colobus angolensis</i>)	97,78	96,32	92,37	74,87	90,46	
		Cercopitècids (Micos del vell món)	Macaco (<i>Macaca mulatta</i>)	92,38	93,83	90,07	92,34	91,21	
			Rinopitec negre (<i>Rhinopithecus bieti</i>)	93,81	94,94	91,97	93,4	85,02	
		Cèbids (Micos del nou món)	Mico esquiroi (<i>Saimiri boliviensis</i>)	99,26	87,36	30,61	43,51	42,66	
			Lèmur (Índrids)	Lèmur (<i>Propithecus coquereli</i>)	84,29	85,94	65,35	58,96	61,44
	Rodentia	Múrids	Ratolí (<i>Mus musculus</i>)	71,5	74,64	33,73	36,87	38,49	
			Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	71,01	73,7	31,94	37,24	33,13	
	Artiodactyla	Suides	Porc (<i>Sus scrofa</i>)	66,3	79,62	47,05	44,09	37,86	
		Bòvids	Vaca (<i>Bos taurus</i>)	74,76	78,83	50,06	41,06	41,29	
		Delfínids	Orca (<i>Orcinus orca</i>)	75,24	80,73	45,23	41,82	36,72	
	Carnívora	Cànids	Gos (<i>Canis lupus</i>)	76,19	79,94	39,7	50,41	39,03	
	Sirenía	Triquèquid	Manatí (<i>Trichechus manatus</i>)	78,57	82,31	42,72	49,63	46,73	
	Monotremata	Ornitòrrinquids	Ornitòrrinc (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	65,99	69,38	31,42	35,94	36,81	
	Aus	Struthioniformes	Estrucioníds	Estruç (<i>Struthio camelus</i>)	77,62	66,13	15,89	33,47	37,2
		Galliformes	Fasiànids	Gallina (<i>Gallus gallus</i>)	68,07	61,46	46,88	31,71	40,27
Rèptils	Squamata	Policròtids	Llangardaix (<i>Anolis carolinensis</i>)	71,52	62,37	25,6	31,22	36,8	
	Testudines	Trioníquids	Tortuga (<i>Pelodiscus sinensis</i>)	75	71,1	35,26	28,96	38,74	
Amfibis	Anura	Pípids	Granota (<i>Xenopus tropicalis</i>)	60,66	55,36	31,14	31,73	37,75	
Peix	Cypriniformes	Ciprínid	Peix zebra (<i>Danio rerio</i>)	46,7	55,49	33,76	32,57	36,18	
	Condroictis	Cartilaginós	Tauró elefant (<i>Callorhynchus milii</i>)	50,55	55,83	32,46	39,37	37,42	

Figura 14. Estudi de la conservació evolutiva de la proteïna i diferents regions del gen *FXN*. Es va calcular el percentatge d'identitat mitjançant alineaments, de la seqüència proteïna frataxina, seqüència d'ADN codificant de frataxina, seqüència de l'intró 1, seqüència de 5 kb de la regió promotora i seqüència 3'UTR no codificant del gen *FXN*, en diferents espècies d'animals vertebrats respecte *Homo sapiens*, classificades filogenèticament per classe, ordre i família. L'escala de colors indica visualment el percentatge d'identitat, essent el verd més elevat, similar a *Homo sapiens* i vermell més baix.

En general, la seqüència aminoacídica de la proteïna i la seqüència d'ADN codificant van ser les més conservades en cadascuna de les espècies vertebrades quan es van comparar amb les altres regions analitzades. Això té un sentit evolutiu essencial, ja que els exons, que són les seqüències d'ADN a partir de les quals es sintetitza la proteïna han de mantenir els dominis i la seqüència invariable o amb pocs canvis per a que la proteïna pugui adoptar la forma terciària i desenvolupar la mateixa funció en les cèl·lules dels diferents organismes. Les seqüències de l'intró 1, 5 kb del promotor i la regió 3'UTR van mostrar una disminució de la seva similitud pràcticament per igual, en general d'aproximadament entre 10-65% respecte la que mostraven en proteïna per cada

espècie, excepte els simis, gibons i els micos del vell món, els quals van mantenir una similitud d'aquestes seqüències similar a la que tenien en la proteïna respecte *Homo sapiens*.

El gen *FXN* va demostrar estar altament conservat en simis, gibons i micos del vell món amb una conservació respecte *Homo sapiens* per sobre del 85% en totes les regions del gen analitzades, excepte específicament 5 kb del promotor del gibó i el còlob amb un 75% d'identitat. A partir dels micos del vell món les regions no codificants del gen *FXN*, és a dir, l'intró 1, promotor i 3'UTR ja no estaven conservades, tenint entre 15-65% d'identitat en les altres espècies respecte els humans. El fet que les repeticions GAA de l'intró 1 es trobin a l'interior d'una seqüència Alu, que evolutivament va aparèixer a partir de l'ordre dels primats, reforça l'alta identitat trobada en l'intró 1 del gen *FXN* en comparació amb espècies d'altres ordres i famílies.

Posteriorment, es va analitzar detalladament cadascuna de les regions esmentades per trobar zones altament conservades que potencialment poguessin ser importants en la regulació del gen. En la regió de 5 kb de promotor i l'intró 1 del gen *FXN* es van trobar 4 i 3 zones altament conservades, respectivament (**Figura 15**). Mentre que la regió 3' del gen *FXN* que no es tradueix (3'UTR) va presentar una conservació uniforme al llarg de la seva seqüència, i particularment al llarg dels primers 4.200 pb (**Figura 16**), on s'havien descrit 10 llocs d'unió de microARN (ARNmi) que podien participar en la regulació del gen (568,569), suggerint que aquesta regió podia tenir papers importants en la regulació de l'expressió de la frataxina.

1.2. Predicció d'elements reguladors en el gen *FXN*.

Per identificar possibles elements reguladors transcripcionals del gen *FXN*, es va analitzar bioinformàticament la seqüència de 5 kb immediatament abans del codó d'inici de traducció i les primeres 1.600 pb de l'intró 1. Es van seleccionar únicament els primers 1.600 pb de tot l'intró 1 perquè es va identificar com un dels grups de seqüències conservades evolutivament, perquè estan pròximes al lloc d'inici transcripcional descrit en el gen *FXN* i inclouen les repeticions GAA, que en expansió anormal, causen la deficiència de frataxina i la patologia FRDA. En total, es van predir 20 llocs d'unió per a 10 factors de transcripció diferents (**Figura 15**). Dels quals, els més rellevants van ser YY1, NR1D1 i NRF1.

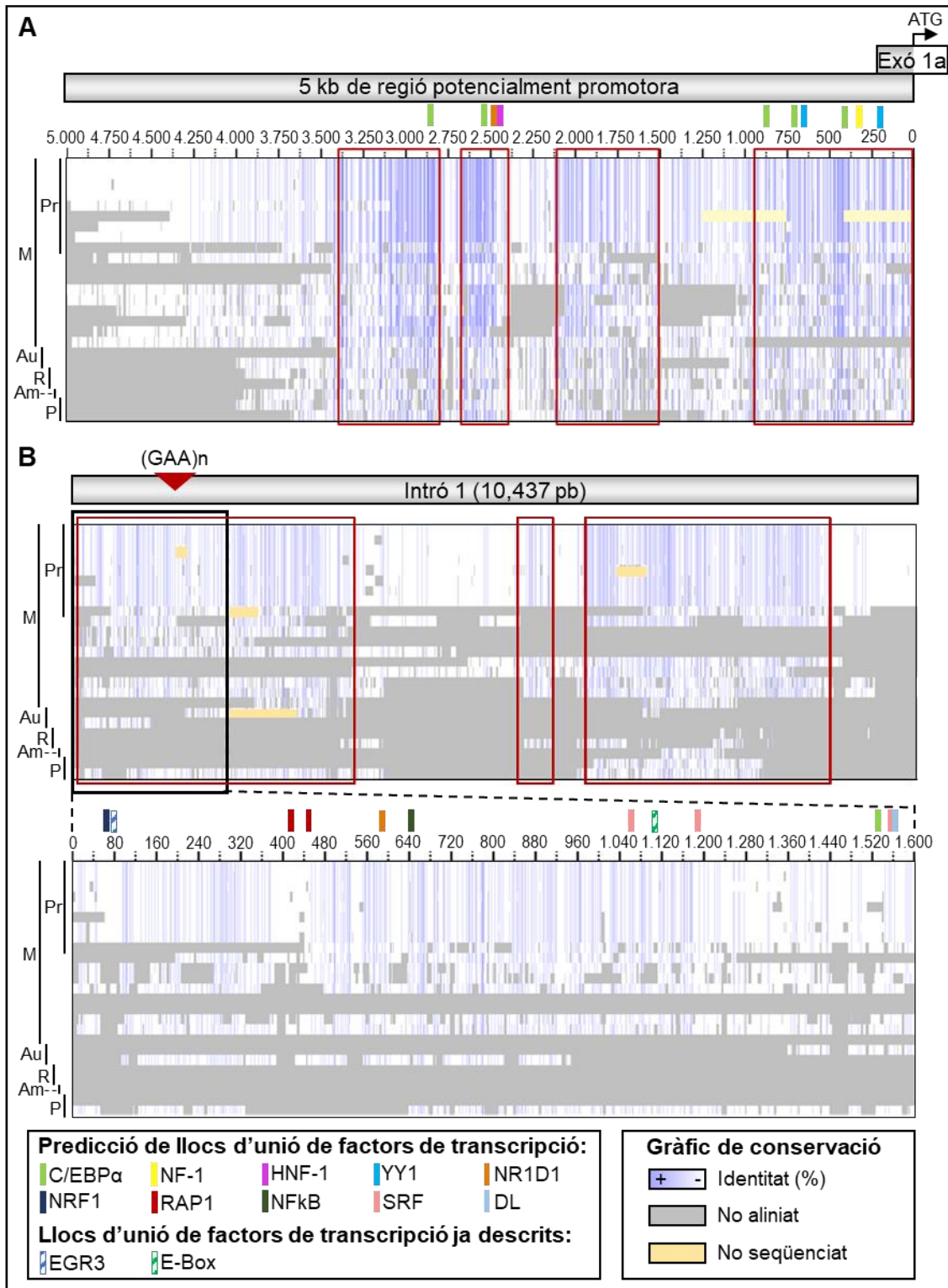


Figura 15. Conservació i predicció d'elements de regulació transcripcional en la seqüència promotora de 5 kb i l'intró 1 del gen *FXN*. El percentatge de conservació de les 5 kb de regió potencialment promotora (A) i intró 1 (B) estan representades en blau. Més intensitat de color, indica més conservació. Cada línia horitzontal representa la seqüència del gen *FXN* en aquella regió per cadascuna de les espècies analitzades en la Figura 14. En gris estan representades les regions no alineades, i en groc les regions que no estan seqüenciades en el genoma de referència. Les espècies es van agrupar filogenèticament en els

grups: primats (P), mamífers (M), aus (Au), rèptils (R), amfibis (Am) i peixos (P). Les caixes amb línia vermella marquen els grups de seqüències més conservats evolutivament. Les caixes de colors de sobre el gràfic de conservació mostren els diferents llocs predits d'unió de factors de transcripció, i les caixes ratllades representen els factors de transcripció ja descrits.

El factor de transcripció YY1 s'expressa de manera ubiqua i està implicat en la repressió i activació de promotors. Normalment s'uneix prop dels llocs d'inici de transcripció. La seva activitat està molt influenciada per la metilació de l'ADN i està involucrat en la modificació d'histones, podent dirigir les histones deacetilases i les histones acetiltransferases cap als promotors. Es va predir que el factor de transcripció YY1 es localitzava prop del lloc d'inici de transcripció del gen *FXN*, concretament a uns 250 pb. La seva localització i els canvis epigenètics a nivell de metilació i compactació de la cromatina deguts a l'expansió anormal del triplet GAA en l'atàxia de Friedreich, suggereixen que podria tenir un paper important en la regulació transcripcional del gen *FXN*.

Els llocs d'unió NR1D1 es van predir tant dins de la seqüència promotora de 5 kb com dins l'intró 1 del gen *FXN*. La seva activitat està regulada de forma hemo-dependent i està implicat en la secreció d'insulina i relacionat a malalties cardiovasculars. Donat que la frataxina està directament implicada en la biosíntesi de grups hemo i els símptomes habituals en pacients amb FRDA inclouen diabetis i cardiomiopatia, dona suport a que NR1D1 sigui un regulador potencial del gen *FXN*.

NRF1 és un factor de transcripció que regula l'expressió de gens implicats en la biosíntesi de grups hemo. S'ha descrit que la reducció dels nivells de frataxina en pacients amb FRDA comporta una alteració de les vies de biogènesi mitocondrial i una disminució de PGC1a, un activador de NRF1. La disminució de PGC1a condueix a una reducció de l'activitat NRF1 i, per tant, a una expressió reduïda de les seves dianes de regulació establint un vincle entre NRF1 i *FXN* (276). El lloc d'unió predit per a aquest factor de transcripció en el gen *FXN* localitzava prop de l'exó 1, on s'havia descrit la presència d'unió d'altres factors de transcripció (114,122).

Altrament, el gen *FXN* conté una regió 3'UTR molt llarga amb 6.365 pb, la qual s'ha suggerit que pot tenir un paper en la regulació de l'expressió del gen *FXN*, però malgrat això a dia d'avui encara no s'ha descrit amb claredat. Els microARN (ARNmi) són molècules curtes d'ARN que poden unir-se sobretot a la regió 3'UTR dels ARNm regulant l'expressió dels gens posttranscripcionalment. Actualment ja s'han descrit 10 ARNmi que s'uneixen específicament en la regió 3'UTR de *FXN* (568,569). En l'estudi de predicció bioinformàtica es van identificar 97 possibles dianes d'unió de ARNmi al llarg de la regió 3'UTR de *FXN* (**Figura 16**), 95 de les quals no han estat prèviament descrites ni validades experimentalment. Interessantment, la majoria de les seqüències ARNmi predites es van trobar en els primers 400 pb de la zona 3'UTR, fet que

indica que particularment aquesta regió podria ser important per a l'estabilització dels transcrits de *FXN*.

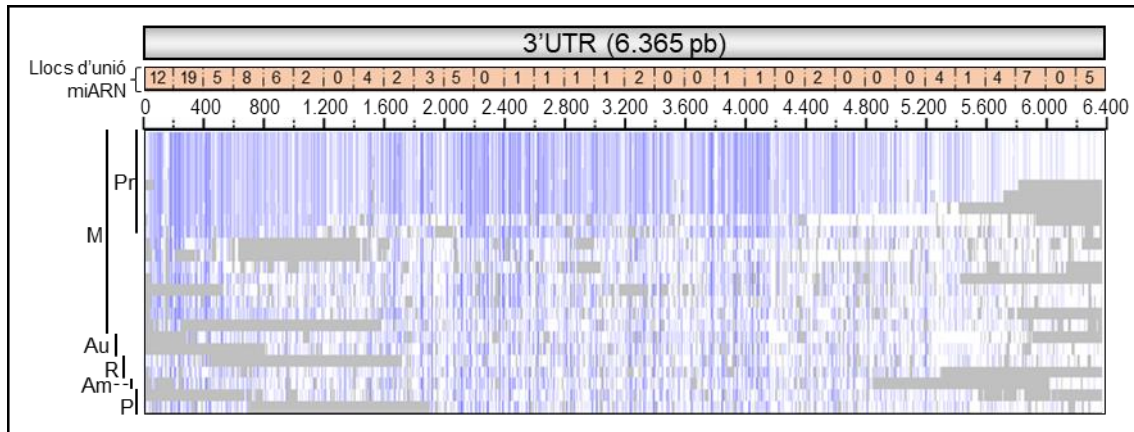


Figura 16. Anàlisi de la regió 3'UTR del gen *FXN*. La conservació de la regió 3'UTR del gen *FXN* es va representar de la mateixa manera que en la Figura 15. Els números en els quadres rosats sobre el panell de conservació representen el número de llocs diana de ARNm predits cada 200 pb.

1.3. Comparació entre la frataxina humana i ratolí.

Fins l'actualitat, en el gen humà *FXN* s'han descrit 4 transcrits d'ARNm que potencialment poden codificar una forma de frataxina, mentre que en el ratolí únicament se n'han descrit 2. En ambdues espècies, el transcrit 1 és el més abundant en tots els teixits i és el que codifica per la proteïna canònica més expressada, àmpliament estudiada, i que desenvolupa la seva funció en la mitocondria.

Donat que aquest estudi tracta principalment d'avaluar una teràpia gènica en un model de ratolí humanitzat per la frataxina (YG8R) que sigui alhora potencialment translacional per al tractament en humans, en la qual es pretén utilitzar la seqüència de frataxina humana en els ratolins, es va estudiar i comparar les seqüències del gen i la proteïna frataxina d'humà i ratolí analitzant de manera bioinformàtica la seva similitud, capacitat per entrar a la mitocondria i per desenvolupar la mateixa funció.

Primer es va analitzar el grau d'identitat de la seqüència nucleotídica codificant del transcrit 1 d'ARNm de frataxina d'humà (633 pb) i de ratolí (624 pb), ambdós amb els exons 1a, 2, 3, 4a i 5a (**Figura 17**); i la seqüència aminoacídica precursora de la isoforma 1 de frataxina humana (210 aa) i de ratolí (207 aa) (**Figura 18**), mitjançant els alineaments de les seqüències.

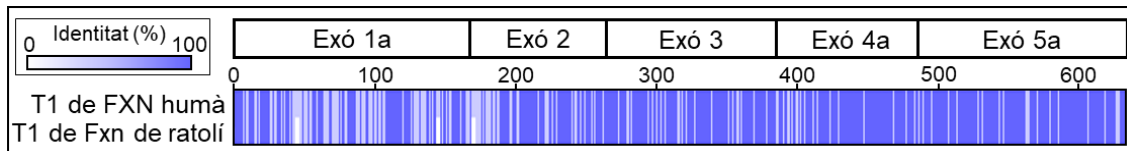


Figura 17. Conservació entre les seqüències d'ARNm dels transcrits 1 de frataxina humana i de ratolí. La intensitat de blau indica el percentatge d'identitat. Els números de sobre la identitat indiquen la mida de la seqüència en pb. Les caixes en blanc corresponen proporcionalment a la mida de la seqüència dels exons codificants en ambdós transcrits 1 de frataxina.

El total de la seqüència codificant del transcrit 1 d'ARNm de frataxina de ratolí té una identitat del 74,2% respecte el d'humà. De manera similar la isoforma 1 de la proteïna frataxina de ratolí té un 71,5% de similitud respecte la isoforma 1 humana. També es va realitzar l'alineament individual de manera separada de les seqüències d'ARNm i de proteïna que corresponen a cadascun dels exons. Per una banda, l'exó 1 amb una identitat del 54,7% pel transcrit d'ARNm i 37,7% per la proteïna; i l'exó 2 amb 64,2% i 45,2% d'identitat pel transcrit d'ARNm i proteïna, respectivament; van ser els exons amb menys identitat. Per l'altra, els exons 3, 4a, 5a es van trobar molt conservats, per sobre del 81% d'identitat en la seqüència del transcrit i per sobre del 92% d'identitat en la seqüència de proteïna. Això suggereix que tant la proteïna de ratolí com humana mantenen una funció comú, degut a que es va descriure que la part funcional es trobava en l'extrem carboxil de la proteïna. L'alineament de la forma madura de la isoforma 1 de frataxina humana i ratolí, de 130 aa ambdues, que localitza a la mitocondria i desenvolupa la part funcional, va mostrar una identitat del 90,77%, mantenint els residus acídics, que potencialment poden d'unir-se a ferro, invariables entre ambdues formes (**Figura 18**).

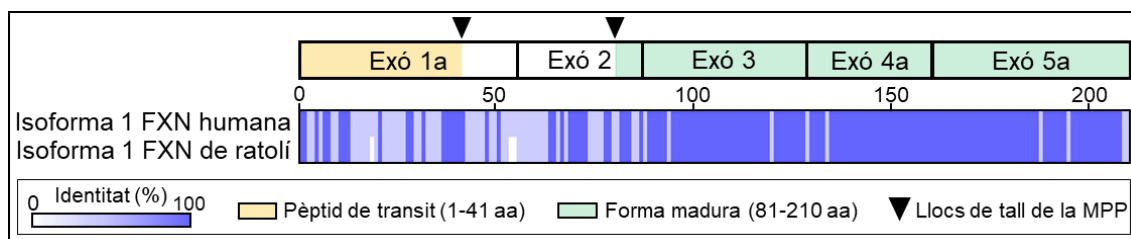


Figura 18. Conservació entre les isoformes 1 de proteïna frataxina humana i ratolí. La intensitat de blau indica el percentatge d'identitat. Els números de sobre la identitat indiquen la mida de la seqüència en aminoàcids (aa). Les caixes corresponen proporcionalment a la mida de la seqüència dels exons codificants en ambdós isoformes 1 de frataxina. En color beix s'indica la seqüència del pèptid de transit, i en verd la forma madura. Els triangles negres indiquen el lloc de tall de la MPP.

En l'exó 1a, està descrit que els primers 41 aa de la proteïna precursora frataxina humana, codifiquen per l'anomenat pèptid de transit, que és una seqüència de localització mitocondrial que condueix la proteïna frataxina a la mitocondria, on és tallada per la peptidasa de processament mitocondrial (MPP) a la seva forma madura i de manera que queda internalitzada en la

mitocòndria. Donada la baixa identitat en aquest fragment de la proteïna entre humà i ratolí, que va ser de 42,5%, es va analitzar amb dos programes de predicció diferents, si la proteïna frataxina de ratolí contenia seqüència de localització mitocondrial i si era capaç de ser processada per la MPP. Es va determinar que ambdós isoformes 1 contien seqüència de localització mitocondrial en l'extrem N-terminal, amb un valor de 0,996 i 0,82 sobre 1, per la frataxina humana; i 0,996 i 0,86 per la frataxina de ratolí. Com a control es va incloure la isoforma 4 de la frataxina humana, que no localitza en la mitocòndria degut a que no té l'exó 1a i per tant manca de l'extrem N-terminal que conté el pèptid de transit (veure apartat 9.3 de la introducció), amb uns valors de 0,000 i 0,17. A més, es va determinar que la MPP és capaç de realitzar el tall entre els residus glicina i lisina compartits en ambdós organismes, que corresponen a l'aminoàcid 41 en l'humà i 40 en el ratolí.

2. Estudi de l'expressió d'ARNm i proteïna frataxina en pacients amb atàxia de Friedreich.

Per tal de comprovar quins nivells tenen les persones afectades d'atàxia de Friedreich i determinar la quantitat de frataxina que es necessita expressar per evitar o revertir la fisiopatologia característica de la malaltia, es van quantificar els nivells d'ARNm i proteïna frataxina a partir de cèl·lules sanguínies i cèl·lules fibroblasts extretes de pacients amb atàxia de Friedreich, d'individus sans portadors de la mutació i individus sans no portadors. Si bé ja es van descriure els nivells dels individus afectes, l'objectiu en aquest estudi a més va ser conèixer la relació dels nivells de frataxina entre individus dins de la mateixa família i així correlacionar els valors de manera més fidel, reduint al màxim la variabilitat genètica, ja que tenen un fons genètic molt semblant. Alhora, també va permetre comparar la correlació entre els nivells d'expressió d'ARNm i proteïna frataxina en diferents tipus cel·lulars.

2.1. Nivells d'expressió d'ARNm de *FXN* de cèl·lules de pacients amb FRDA.

Es va avaluar l'expressió dels nivells d'ARNm de frataxina mitjançant *droplet digital* PCR (ddPCR) en cèl·lules sanguínies extretes d'una família de 5 individus, on ambdós pares eren portadors de la mutació amb una expansió de repeticions GAA, amb tres fills, cadascun amb els possibles genotips que es poden heretar, és a dir, un fill sa no portador, un fill sa portador i un fill afecte d'atàxia de Friedreich (**Figura 19B**).

La ddPCR va permetre quantificar el número de còpies d'ARNm de *FXN* present en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica de manera més sensible, precisa i exacta que altres mètodes com la qRT-PCR. En la mateixa reacció de PCR es van utilitzar els encebadors i sonda marcada amb el fluoròfor FAM per amplificar específicament l'ARNm de tots els transcrits de frataxina

(dHsaCPE5031641, Bio-Rad Laboratories) i encebadors i sonda marcada amb fluoròfor HEX per amplificar l'ARNm de la proteïna d'unió a TATA (*TBP*) com a control intern. Es van quantificar el número de *droplets* o gotes positives del total obtingudes tant per l'ARNm de frataxina com pel control intern *TBP* (**Figura 19A**). Els valors de *FXN* es van normalitzar als valors del control intern per cadascuna de les mostres, i es va establir com a percentatge màxim de frataxina, els nivells d'ARNm *FXN* obtinguts d'un individu control no portador aliè a la família.

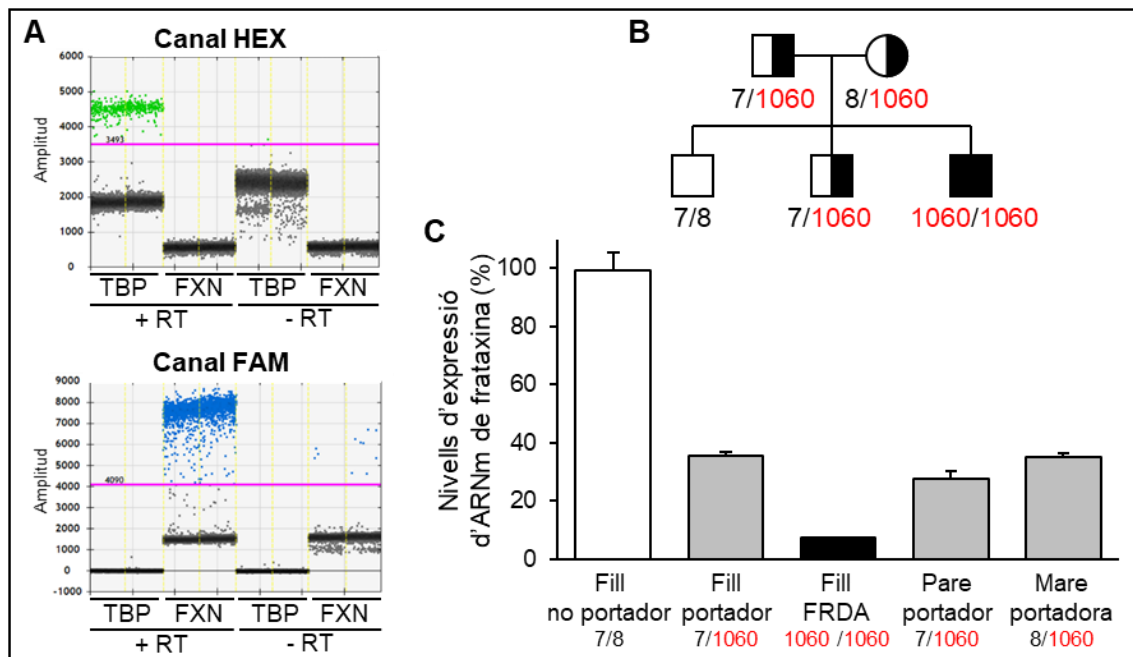


Figura 19. Quantificació dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica en un nucli familiar amb un individu afecte d'atàxia de Friedreich. A) Diagrama de la lectura de fluorescència resultant de la ddPCR pels fluoròfors HEX i FAM. Cada punt fa referència a una gota (verd per les *TBP* positives, blau per les *FXN* positives i gris per les negatives). La línia violeta marca el llindar a partir del qual els *droplets* van ser positius. En una de les reaccions pel *TBP* i *FXN* no es va afegir l'enzim retrotranscriptasa (- RT) en la reacció com a control per descartar l'amplificació inespecífica d'ADN genòmic. B) Arbre genealògic familiar amb el genotip i número de repeticions del triplet GAA en cada al·lel del gen *FXN* dels 5 individus que s'analitzen. En vermell es mostren les repeticions GAA que són patològiques. Els quadrats indiquen el gènere masculí i la rodona femení. En blanc s'indica no portador, meitat blanc meitat negre indiquen portadors i completament negre indica l'individu afecte amb FRDA. C) Percentatge dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina de cada individu, normalitzats als nivells d'expressió d'un individu sa no portador, aliè a la família.

Els resultats de la quantificació d'ARNm de frataxina en sang total van demostrar que el fill no portador de l'expansió GAA tenia uns nivells del 99,2%, pràcticament iguals als de la mostra control. El fill portador asimptomàtic, heterozigot per l'expansió GAA, va presentar uns nivells del 35,5%; semblants als valors del pare i la mare, també portadors, amb 27,8% i 35,1%

respectivament. Finalment, el fill amb atàxia de Friedreich va resultar tenir els nivells d'ARNm de frataxina més baixos, amb un 7,4% en cèl·lules de sang perifèrica (**Figura 19C**).

De manera semblant, es van avaluar els nivells d'ARNm de frataxina en cèl·lules fibroblasts d'individus sans no portadors, individus sans portadors i individus afectes FRDA de diverses famílies, aquest cop per qRT-PCR i utilitzant la quantificació dels nivells d'ARNm de beta-2-microglobulina (*B2M*) com a control intern (**Figura 20A**). Els nivells d'ARNm de frataxina dels pacients amb FRDA en cèl·lules fibroblasts van oscil·lar entre 20 i 39,2% respecte la mitjana dels individus no portadors que es va establir com a referència, a 100%. En canvi, els individus portadors van mostrar valors de frataxina més elevats, entre 37-64,8%. Interessantment, entre els individus afectes, el pertanyent a la família 1, que contenia un número de repeticions més elevat, amb 1.060 en l'al·lel curt, va evidenciar uns nivells de frataxina més baixos. De la mateixa manera, un individu de la família 1, va expressar els valors més baixos dins del grup dels individus portadors (**Figura 20A**).

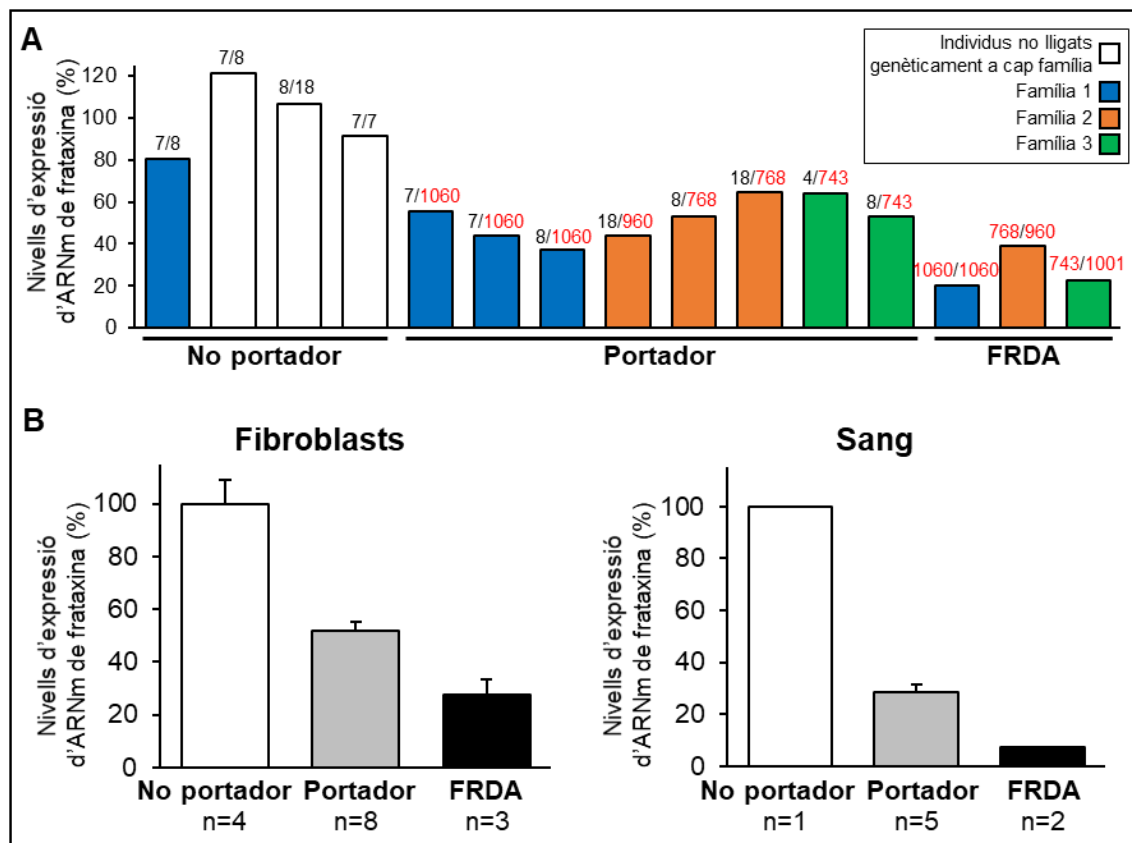


Figura 20. Nivells d'expressió d'ARNm de frataxina en l'atàxia de Friedreich. **A)** Quantificació dels nivells de d'ARNm de frataxina en cèl·lules fibroblasts extretes d'individus no portadors, portadors i afectes de FRDA de diferents famílies. Es va determinar el valor 100% d'expressió de frataxina a la mitjana dels valors dels individus no portadors. Els individus que eren familiars genèticament es van marcar amb el mateix color. A sobre de cada barra hi ha el número de repeticions GAA que contenia cadascun dels individus analitzats, marcades en vermell les repeticions que tenien un número patològic. **B)** Comparació de la mitjana dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina en cèl·lules fibroblasts i mononuclears de sang

perifèrica en individus no portadors, portadors i afectes de FRDA. Es va definir la mitjana dels nivells d'ARNm de frataxina del grup d'individus no portadors com a percentatge màxim d'expressió (100%), en ambdós tipus cel·lulars.

De cara a realitzar una teràpia gènica personalitzada per incrementar els nivells de frataxina, es va poder quantificar el percentatge d'expressió d'ARNm de frataxina que calia incrementar per cada família per separat per arribar a uns nivells no patològics, calculant la diferència entre els nivells de l'individu afecte i el portador amb els nivells més baixos de cada família. Per tant, el rang d'increment de frataxina necessari per les famílies 1, 2 i 3 va ser d'un 17%, 3,9% i 30,6%, respectivament en cèl·lules fibroblasts. D'aquesta manera es va determinar la heterogeneïtat en els nivells d'ARNm de frataxina entre famílies i entre individus del mateix grup, en gran part degut al número diferent d'expansions patològiques GAA i a la diferent edat de cadascun d'ells.

Per conèixer els nivells patològics d'expressió d'ARNm de frataxina que tenen els pacients amb atàxia de Friedreich i els nivells no patològics dels individus portadors en diferents tipus cel·lulars, es va calcular la mitjana de cadascun dels grups en cèl·lules fibroblasts i cèl·lules mononuclears de sang perifèrica. En les cèl·lules fibroblasts els individus afectes amb atàxia de Friedreich van mostrar un 27% d'expressió d'ARNm de frataxina respecte als individus sans no portadors, mentre que els individus portadors van expressar un 52% (**Figura 20B**). En les cèl·lules sanguínies, la quantitat d'ARNm de frataxina en els individus afectes va ser del 7% i dels individus portadors del 29% (**Figura 20B**), uns valors pràcticament iguals als que s'havien obtingut mitjançant la ddPCR en l'estudi d'únicament una família (**Figura 19C**). Aquests valors es van calcular relativament als individus sans no portadors, assumint que tenien un 100% d'expressió de frataxina, en ambdós tipus cel·lulars. D'aquesta manera, es va definir que era necessari incrementar els nivells d'ARNm de frataxina dels individus amb FRDA en un rang aproximadament entre 22-25% per aconseguir uns nivells de frataxina no patològics i per tant potencialment terapèutics.

2.2. Nivells d'expressió de la proteïna frataxina en cèl·lules de pacients amb FRDA.

Amb l'objectiu de conèixer els nivells d'expressió de proteïna frataxina dels pacients amb FRDA, saber la quantitat mínima de frataxina que cal expressar per no tenir la patologia i veure com correlacionen els nivells de proteïna amb els nivells d'ARNm, es van avaluar els nivells d'expressió de la proteïna frataxina de cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA, individus portadors i no portadors mitjançant western-blot (**Figura 21A**). Es van seleccionar 3 individus no portadors, 3 individus portadors i 5 individus afectes de FRDA. Donat que l'edat influeix en els nivells de frataxina, es van seleccionar com a individus portadors, els que eren germans dels individus afectes amb una edat més similar per poder fer comparatives intra i interfamiliars.

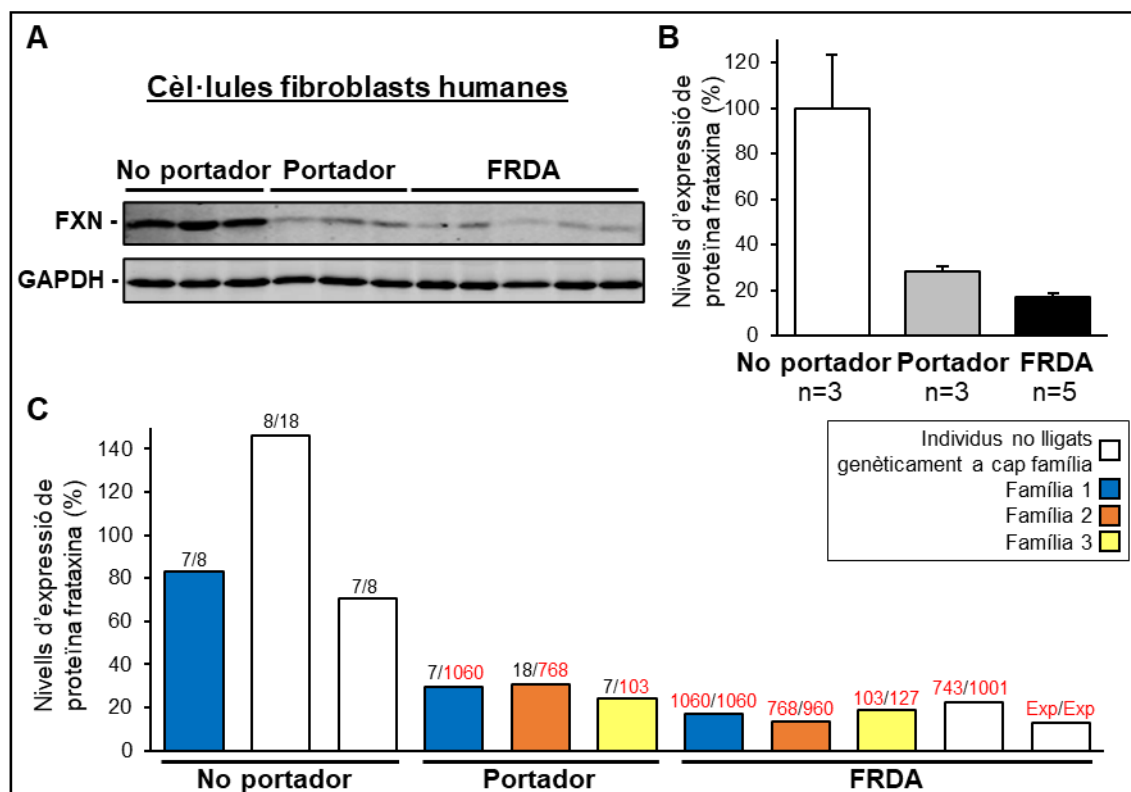


Figura 21. Nivells d'expressió de proteïna frataxina en cèl·lules fibroblasts humanes. **A)** Western-blot d'extracte total de proteïna de cèl·lules fibroblasts d'individus no portadors, portadors i afectes de FRDA. Cada línia fa referència a un individu. Es va utilitzar els nivells d'expressió de GAPDH com a control de càrrega. **B)** Quantificació de la mitjana dels nivells d'expressió de frataxina en cèl·lules fibroblasts d'individus no portadors, portadors i afectes de FRDA. Es va definir la mitjana dels nivells d'ARNm de frataxina del grup d'individus no portadors com a percentatge màxim d'expressió (100%). **C)** Nivells d'expressió de proteïna frataxina de cadascun dels individus per separat. Els individus amb el mateix color pertanyen a la mateixa família, en condició de germans, a excepció dels que estan en color blanc. El número de repeticions GAA en el gen *FXN* es mostra a sobre de les barres. El número d'expansions patològiques està marcat en vermell. Exp/Exp: al·lels expandits amb un número de repeticions GAA no determinat.

Els individus afectes de FRDA van mostrar uns nivells d'expressió de frataxina d'un 17% respecte la mitjana dels individus no portadors, mentre que els individus portadors van expressar uns nivells del 28% (**Figura 21B**). Aquests resultats van indicar que en cèl·lules fibroblasts es necessitaria incrementar aproximadament un 11% els nivells de proteïna frataxina per tal que els individus afectes tinguin uns nivells dins d'un rang no patològic. En comparació amb els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina, els nivells d'expressió de proteïna tant dels individus afectes FRDA com dels individus portadors, van ser inferiors, amb una reducció del 10% i 24% respectivament, quan es van comparar amb els nivells dels individus no portadors. Les diferències entre els individus afectes i portadors dins d'una mateixa família van ser de 12,8% en la família 1, 17,3% en la família 2, i 5,2% en la família 3 (**Figura 21C**).

2.3. Estudi de l'expressió de frataxina en teixits neurològics d'un pacient amb FRDA.

Es van caracteritzar els nivells d'expressió de proteïna frataxina en diferents teixits del sistema nerviós d'un individu afecte de FRDA comparant-los amb els nivells d'expressió en els mateixos teixits d'un individu sa no portador de la mutació. D'aquesta manera es va quantificar els nivells d'expressió relatius de frataxina que aproximadament tenien els pacients amb FRDA. L'estudi també va permetre determinar els teixits del sistema nerviós que tenien més expressió de frataxina.

Es van avaluar els teixits nucli dentat (DN), protuberància del tronc encefàlic (PONS), medul·la espinal cervical (SC-C) i medul·la espinal lumbar (SC-L) d'un individu sa no portador home de 78 anys, i d'un individu amb atàxia de Friedreich dona de 32 anys. A partir de 50 µg d'extracte total de proteïna de cadascun dels teixits i mitjançant western-blot, es van quantificar els valors d'intensitat de les bandes de frataxina i es van normalitzar als valors d'intensitat del GAPDH que es va utilitzar com a control de càrrega (**Figura 22A**).

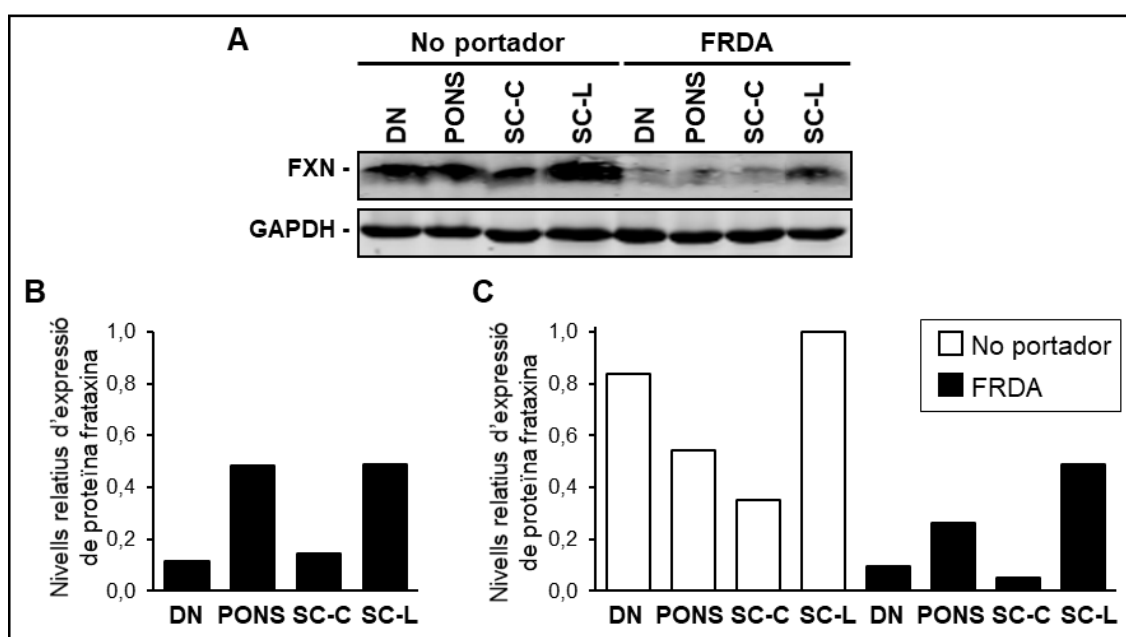


Figura 22. Nivells d'expressió relatius de frataxina en teixits del sistema nerviós central. **A)** Western blot a partir d'extracte total de proteïna del nucli dentat (DN), protuberància del tronc encefàlic (PONS), medul·la espinal cervical (SC-C) i medul·la espinal lumbar (SC-L) d'un individu d'un individu sa no portador baró de 78 anys, i d'un individu amb atàxia de Friedreich dona de 32 anys. Es van utilitzar els nivells d'expressió de GAPDH com a control de càrrega. **B)** Quantificació dels nivells d'expressió relatius de frataxina de cadascun dels teixits de l'individu amb FRDA. Els valors es van comparar amb els nivells d'expressió de l'individu no portador, els quals se'ls va assignar el valor màxim 1 a cadascun dels teixits per separat. **C)** Nivells d'expressió de frataxina en cadascun dels teixits del sistema nerviós de l'individu no portador (en blanc) i l'individu FRDA (en negre). Els valors es van relativitzar al valor de la medul·la espinal lumbar de l'individu no portador, que va ser el més alt i per tant, se li va assignar el valor 1.

Per fer la comparació relativa dels nivells d'expressió de frataxina de cadascun dels teixits de l'individu afecte i l'individu no portador, es va assignar el valor màxim 1 als nivells d'expressió de frataxina de cadascun dels teixits de l'individu no portador. D'aquesta manera, els nivells d'expressió de frataxina en els teixits del pacient amb FRDA van ser de 0,12 en el nucli dentat, 0,49 en la protuberància, 0,15 en la medul·la espinal cervical i 0,49 en la medul·la espinal lumbar. En general, els nivells relatius deficients de frataxina van situar-se en un rang entre el 12-49% respecte els nivells de l'individu sa (**Figura 22B**).

Els nivells d'expressió més alts de frataxina en l'individu humà sa no portador es van veure en la part lumbar de la medul·la espinal, la qual se li va assignar el valor 1, seguit del nucli dentat 0,84; la protuberància 0,54; i finalment la part cervical de la medul·la espinal 0,35 (**Figura 22C**). En l'individu afecte amb FRDA, la medul·la espinal també va ser el teixit amb més expressió, però curiosament, la resta de teixits no van seguir el mateix ordre, demostrant una disminució més dràstica de la proteïna frataxina en el nucli dentat i la medul·la espinal cervical. En aquest estudi no es va poder realitzar un anàlisi estadístic conclusiu perquè únicament es va incloure 1 individu de cada grup, degut a la dificultat d'obtenció dels teixits humans de pacients amb FRDA. No obstant això, els resultats inicials d'aquest estudi preliminar van servir com a indicació per futurs estudis més extensos.

3. Caracterització de la patologia mitocondrial en l'atàxia de Friedreich.

3.1. Avaluació de la funció mitocondrial i de l'estrès oxidatiu en cèl·lules de pacients amb FRDA.

Per tal d'avaluar la patologia mitocondrial i l'estrès oxidatiu característics en l'atàxia de Friedreich i tenir biomarcadors per la posterior avaluació del tractament de teràpia gènica en el model de ratolí amb la malaltia, es van analitzar mitjançant western-blot, extractes de proteïna de cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA i es van comparar amb els familiars directes sans portadors i sans no portadors (**Figura 23A**).

Es va determinar els nivells d'expressió relatius de les proteïnes mitocondrials VDAC1 i ATP5H per a conèixer nivells relatius de mitocòndries en les cèl·lules fibroblasts. El canal 1 d'anions dependent de voltatge (VDAC1) és una porina present en la membrana mitocondrial externa, mentre que la subunitat d de la ATP sintasa (ATP5H) és una proteïna pertanyent al complex V de la cadena transportadora d'electrons que localitza en la membrana mitocondrial interna. Ambdós proteïnes s'han utilitzat àmpliament com a biomarcadors mitocondrials (570).

Per analitzar l'estrès oxidatiu que es genera en les cèl·lules afectes de la malaltia, es va quantificar l'expressió de proteïnes carbonilades a través de la immunodetecció del producte alhídric 4-

hidroxinonenal (4-HNE), que és un biomarcador de peroxidació lipídica; i els nivells d'expressió de la proteïna detoxificadora superòxid dismutasa (SOD1), que converteix els radicals lliures de l'oxigen en compostos estables i no tòxics per la cèl·lula. La peroxidació lipídica causa l'increment de proteïnes carbonilades degut a l'oxidació de les cadenes d'aminoàcids i dels lípids de membrana, formant el producte aldehídic 4-HNE; mentre que la detoxificació de radicals lliures d'oxigen en la cèl·lula és realitzada per la SOD1, de manera que una desregulació dels nivells d'aquesta proteïna incrementa l'estrès oxidatiu en la cèl·lula.

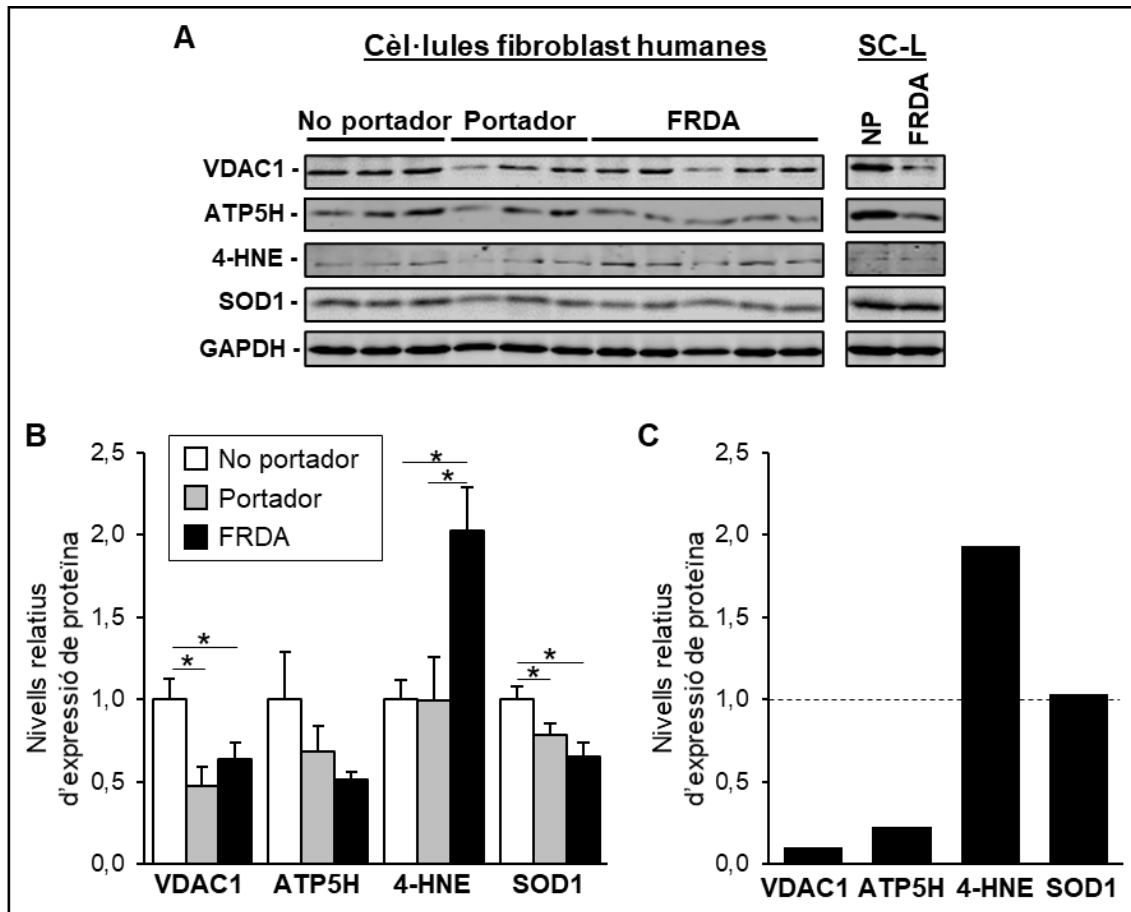


Figura 23. Avaluació de la patologia mitocondrial i l'estrès oxidatiu en pacients amb atàxia de Friedreich. **A)** Es van analitzar cèl·lules fibroblasts d'individus no portadors, portadors i afectes amb FRDA i medul·la espinal lumbar (SC-L) d'un individu no portador (NP) i afecte (FRDA) mitjançant western-blot i es van quantificar els nivells relatius d'expressió de VDAC1, ATP5H, 4-HNE i SOD1 en **B)** cèl·lules fibroblasts i **C)** medul·la espinal lumbar. Es van analitzar 3 individus no portadors, 3 individus portadors i 5 individus afectes FRDA per les cèl·lules fibroblast; i 1 individu no portador i afecte per la medul·la espinal lumbar. Els valors de cada grup es van comparar als nivells d'expressió dels individus no portadors per cada proteïna, que es van normalitzar a 1. La línia discontinua indica els nivells de proteïna relatius de l'individu no portador. El GAPDH es va utilitzar com a control de càrrega. Les barres d'error representen el SEM. * indica una significança estadística $P < 0,05$ entre els grups comparats determinats per la barra.

Per calcular els nivells d'expressió relatius de cadascuna de les proteïnes analitzades, es van comparar els valors de cada individu respecte la mitjana dels nivells d'expressió dels individus sans no portadors per cadascuna de les proteïnes analitzades, essent el valor d'aquests 1.

En la quantificació del número de mitocondries, els pacients amb FRDA van mostrar nivells reduïts d'expressió de VDAC1 i ATP5H en les cèl·lules fibroblast, amb valors de 0,61 i 0,51, respectivament, essent estadísticament menors pel VDAC1 als valors dels individus no portadors [$F_{(2,8)} = 5,174, P = 0,020$]. Curiosament, els individus portadors també van mostrar valors d'expressió inferiors de VDAC1 i ATP5H, amb valors de 0,47 i 0,68, similars als individus afectes amb FRDA, i sent també estadísticament diferents en el VDAC1 als individus sans no portadors [$F_{(2,8)} = 5,174, P = 0,031$]. La quantificació dels biomarcadors d'estrès oxidatiu va evidenciar per una banda l'increment significatiu de 4-HNE i la reducció significativa de la proteïna SOD1 en els fibroblasts dels pacients amb FRDA amb uns valors de 2,02 i 0,65 respectivament [$F_{(2,8)} = 6,359, P = 0,03$] [$F_{(2,8)} = 4,500, P = 0,016$]. Els individus portadors no van mostrar diferències en els nivells de 4-HNE comparat amb els individus no portadors, però sí un descens dels nivells relatius de proteïna SOD1, no tant sever com en els individus afectes, però significatiu [$F_{(2,8)} = 4,500, P = 0,036$] (**Figura 23B**).

En la medul·la espinal lumbar de pacient comparada amb la d'un individu humà, no es van poder extreure resultats conclusius degut a que només es va disposar d'una mida mostral d'1 individu de cada grup. Tot i això, els resultats obtinguts van mostrar que els nivells d'expressió de VDAC1 i ATP5H en el pacient amb FRDA eren molt més baixos que els detectats en cèl·lules fibroblasts, amb valors de 0,1 i 0,22 respectivament, comparat amb els nivells d'expressió de l'individu no portador. Pel que fa a l'estrès oxidatiu, els nivells d'expressió 4-HNE detectats van ser gairebé el doble dels valors dels nivells d'expressió dels individus sans, amb 1,93, similar al que es va veure en les cèl·lules fibroblast. En canvi, no es va identificar canvis en la quantitat de SOD1, on el pacient amb FRDA va mostrar un valor de 1,03 (**Figura 23C**). Per tant, aquests resultats obtinguts en la medul·la espinal lumbar, juntament amb els obtinguts en les cèl·lules fibroblast, van evidenciar una alteració mitocondrial patològica i l'increment de l'estrès oxidatiu.

L'estrès oxidatiu en les cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA es va caracteritzar per l'increment de la peroxidació lipídica i l'acumulació de radicals lliures d'oxigen per deficiència de la proteïna detoxificadora SOD1. En canvi, en la medul·la espinal lumbar del pacient amb FRDA, l'increment de l'estrès oxidatiu es va definir únicament per la presència de peroxidació lipídica, però no per la deficiència de la proteïna detoxificadora SOD1, suggerint l'especificitat de teixit d'aquest biomarcador.

El individu portadors també van presentar un descens significatiu dels nivells d'expressió de VDAC1 i SOD1, amb una tendència disminuïda també d'ATP5H, que tot i que no va ser tant

severa com en els individus amb atàxia de Friedreich, va suggerir que els nivells de deficiència de frataxina són crítics i correlacionen amb el grau d'afectació patològica en les mitocondries.

3.2. Avaluació de la ultraestructura i la morfologia de cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA mitjançant criomicroscòpia tomogràfica de raigs X.

Amb l'objectiu d'elucidar l'afectació a nivell subcel·lular de cèl·lules no neuronals deficientes de frataxina, es va avaluar l'estructura i morfologia de cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA a través de criomicroscòpia tomogràfica de raigs X a partir de llum de sincrotró.

Donat que els fibroblasts són cèl·lules molt grans i de morfologia allargada, el camp de visió de la càmera no va permetre adquirir les imatges del total de la cèl·lula. De manera que per poder realitzar una comparació entre cèl·lules de diferents individus, es va seleccionar la mateixa zona de la cèl·lula fibroblast per a totes. Aquesta zona es va definir per incloure una part del nucli com a referència, i la zona adjacent del citoplasma, ja que es va veure que tenia un contingut més elevat d'òrgànuls. D'aquesta manera es va poder comparar la mateixa zona en totes les cèl·lules de 3 individus no portadors, 4 individus portadors i 4 individus afectes amb FRDA (**Figura 25A**).

A diferència de la microscòpia electrònica de transmissió (TEM), que permet adquirir imatges amb una alta resolució però únicament d'una sola secció bidimensional (2D), la criomicroscòpia tomogràfica de raigs X en la línia MISTRAL del sincrotró ALBA, va permetre l'adquisició de múltiples projeccions bidimensionals de la mateixa zona cel·lular amb un angle de rotació diferent cadascuna, permetent mitjançant el procés de desconvolució, posterior alineament i reconstrucció, la obtenció d'imatges tridimensionals (3D) de l'interior cel·lular. D'aquesta manera es van identificar estructures subcel·lulars com les mitocondries, el nucli, vesícules i gotes lipídiques; per tant, es va poder mesurar volumètricament cadascuna d'aquestes estructures subcel·lulars identificades i comparar-les entre les cèl·lules dels diferents grups d'individus. Tot i això, d'entre els òrgànuls identificats, l'estudi es va focalitzar en les mitocondries perquè per una banda és on localitza la frataxina, i per l'altra, la deficiència d'aquesta proteïna causa disfunció mitocondrial tal com s'ha descrit en determinats tipus cel·lulars dels pacients amb FRDA (571).

En les cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA es va observar la presència de mitocondries amb una morfologia diferent a la comú, caracteritzada per tenir un increment de la seva mida, amb aparença inflada, la matriu buida, i les crestes i la membrana mitocondrial interna disgregades i amb tendència a acumular-se en els pols de la mitocondria. La presència de mitocondries amb aquesta morfologia anormal identificada en els fibroblasts de pacients amb FRDA corrobora el que s'havia vist anteriorment en estudis de microscòpia electrònica en cèl·lules deficientes de frataxina (194,233,572,573), on havien relacionat aquesta morfologia anormal amb la patologia mitocondrial característica de la malaltia causada per la deficiència de

frataxina. Malgrat això, fins ara no s'han reportat estudis detallant, la ultraestructura tridimensional de les mitocòndries de pacients, ni s'ha comparat amb els familiars portadors per entendre millor la seva relació patològica.

Donat que les mitocòndries anormals presentaven qualitativament com a característica morfològica general un increment de la seva mida, es va mesurar la mitjana del diàmetre d'aquestes mitocòndries i es va comparar respecte les mitocòndries amb una morfologia comú. D'aquesta manera, es va determinar quantitativament que les mitocòndries que tenen una morfologia comú, no patològica, presents de manera majoritària en els fibroblasts d'individus no portadors i portadors, tenien un diàmetre de mitjana de 0,63 μm ; mentre que les mitocòndries amb una morfologia anormal, que es van observar majoritàriament en els fibroblasts dels pacients amb FRDA, tenien un diàmetre d'aproximadament 1 μm de mitjana, gairebé el doble que les mitocòndries comunes [$F_{(1,5)} = 21,200$, $P = 0,009$] (**Figura 24B**).

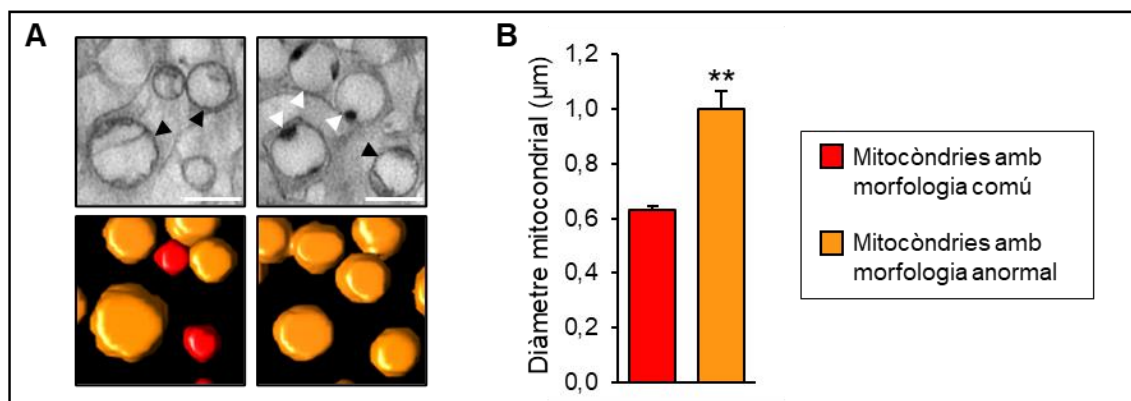


Figura 24. Caracterització de la morfologia mitocondrial de les cèl·lules fibroblasts de pacients amb atàxia de Friedreich. A) Imatges ampliades d'una secció bidimensional (part superior) i la seva reconstrucció volumètrica (part inferior) de l'interior citoplasmàtic d'una cèl·lula fibroblast d'un pacient amb atàxia de Friedreich on s'observen mitocòndries amb una morfologia comú (vermell) i mitocòndries amb una morfologia anormal patològica (taronja). Dins les mitocòndries amb una morfologia anormal, les fletxes negres indiquen les que mantenen les crestes mitocondrials definides, i les fletxes blanques senyalen les que presenten la disrupció i acumulació de les crestes en els pols de la mitocòndria. La barra d'escala indica 1 μm . B) Quantificació de la mitjana del diàmetre de les mitocòndries amb una morfologia comú i anormal. Es van analitzar les mitocòndries dels 3 individus sans no portadors i dels 4 individus amb FRDA. Les barres d'error representen el SEM. ** indica una significança estadística $P < 0,01$.

Interessantment, dins de les mateixes cèl·lules fibroblasts dels pacients afectes es van identificar mitocòndries amb una morfologia anormal heterogènia, indicant que tenien diferents graus de severitat patològica. Determinades mitocòndries mostraven únicament un increment de volum, mantenint les crestes visibles i ben definides, tot i que de manera més separada i menys denses; mentre que altres mostraven també aquest increment de la mida, però ja amb la disrupció de les crestes, que s'acumulaven en els pols de la mitocòndria evidenciant una matriu totalment buida.

La pèrdua de les crestes mitocondrials estableix una evolució progressiva de la morfologia mitocondrial anormal, i suggereix una major severitat patològica a nivell funcional (**Figura 24A**).

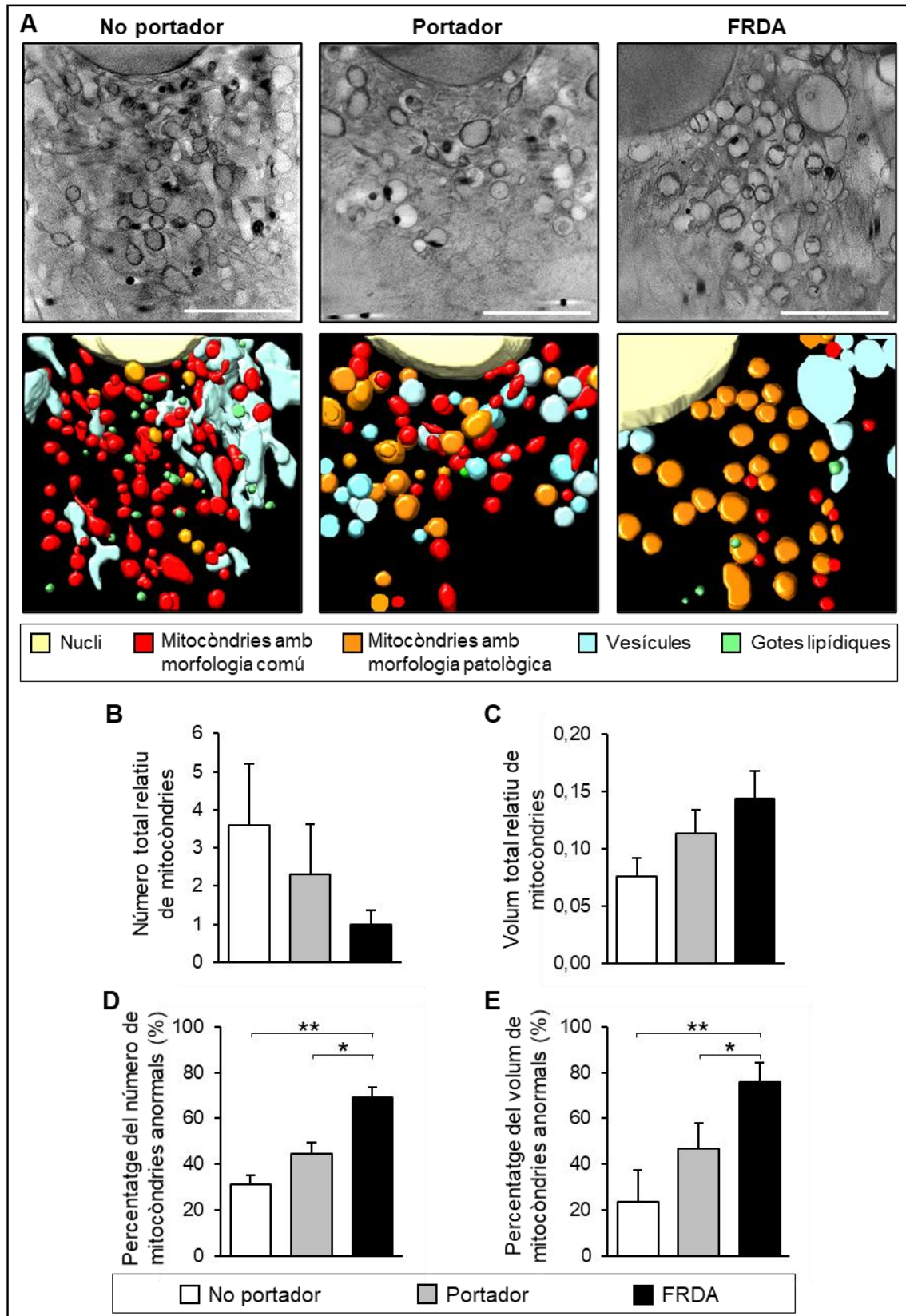


Figura 25. Avaluació ultraestructural i morfològica tridimensional de cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA mitjançant imatges obtingudes per criomicroscòpia tomogràfica de raigs X amb llum de sincrotró. A) Imatges d'una secció bidimensional (part superior) i la seva reconstrucció volumètrica (part inferior) de les estructures subcel·lulars identificades de cèl·lules fibroblasts d'un individu no portador, un individu portador i un individu amb atàxia de Friedreich (FRDA). Les diferents estructures subcel·lulars identificades es van marcar en colors: nucli (groc), mitocondries amb morfologia comú (vermell), mitocondries amb morfologia patològica (taronja), vesícules (blau) i gotes lipídiques (verd). La barra d'escala correspon a 5 µm. **B)** Quantificació del número total de mitocondries relatiu al volum citoplasmàtic de cada cèl·lula. Els valors es van normalitzar al número de mitocondries dels individus afectes FRDA. **C)** Quantificació del volum total de mitocondries relatiu al volum citoplasmàtic de cada cèl·lula. **D-E)** Percentatge del número i volum de mitocondries amb una morfologia anormal patològica respecte el número i volum total de mitocondries, respectivament. Es van analitzar cèl·lules de 3 individus sans no portadors, 4 individus sans portadors i 4 individus amb FRDA. Les barres d'error representen el SEM. * indica una significança estadística $P < 0,05$ entre els grups comparats determinats per la barra; ** indica una significança estadística $P < 0,01$.

Amb les imatges reconstruïdes a partir de les tomografies obtingudes per criomicroscòpia tomogràfica de raigs X es va realitzar un estudi mitocondrial poblacional i volumètric de les cèl·lules fibroblasts com abans mai s'havia fet per l'atàxia de Friedreich.

Inicialment, es va analitzar el número i el volum del total de mitocondries relatiu al volum citoplasmàtic de cada cèl·lula a partir de les tomografies obtingudes dels fibroblasts. Tot i no veure diferències significatives en el número i el volum de mitocondries totals entre els fibroblasts dels individus no portadors, portadors i afectes, sí que es va observar una tendència contradictòria entre aquestes dues mesures. Per una banda, els fibroblasts dels pacients amb FRDA van mostrar una tendència a tenir un número inferior de mitocondries en comparació amb els individus portadors, i més accentuat respecte els individus no portadors. D'altra banda, tot i tenir menys mitocondries, els fibroblasts dels individus afectes van demostrar una tendència a tenir més volum mitocondrial que els individus portadors i no portadors (**Figura 25B-C**). Això va ser degut a la presència de les mitocondries amb morfologia anormal que es va observar en els fibroblasts dels pacients amb FRDA (**Figura 25A**). Contràriament, en els fibroblasts d'individus no portadors i portadors, la majoria de mitocondries mostraven una morfologia comuna, esfèriques amb una mida petita, aproximadament 0,6 µm de diàmetre, amb les crestes mitocondrials definides i una matriu densa.

La quantificació del número i volum d'aquestes mitocondries amb una morfologia anormal va evidenciar que els fibroblasts de pacients amb FRDA presentaven un percentatge significativament més elevat d'aquestes en comparació amb els fibroblasts d'individus portadors i no portadors. Concretament, els pacients amb FRDA van mostrar un percentatge en número i

volum de mitocòndries anormals respecte el total de mitocòndries del 69% i 76% respectivament, comparat amb el percentatge dels individus portadors germans dels afectes, de 44% i 47% [$F_{(2,8)} = 16,671, P = 0,024$] [$F_{(2,8)} = 5,559, P = 0,04$], seguit pels individus no portadors amb el percentatge de mitocòndries anormals més baix, de 31% i 24% respectivament [$F_{(2,8)} = 16,671, P = 0,004$] [$F_{(2,8)} = 5,559, P = 0,009$] (**Figura 25D-E**). D'aquesta manera, els pacients amb atàxia de Friedreich van mostrar un increment patològic aproximat del 25-29% de mitocòndries amb les característiques morfològiques anormals respecte els individus portadors familiars que són sans. Això va suggerir, que l'aparició i increment de mitocòndries amb una morfologia patològica correlaciona de manera inversament proporcional amb els nivells de frataxina que es van quantificar en les cèl·lules fibroblasts dels individus no portadors, portadors i afectes d'atàxia de Friedreich.

Capítol II: Estratègia de teràpia gènica.

1. Model de ratolí YG8R amb atàxia de Friedreich.

El model animal que es va utilitzar per poder desenvolupar aquest estudi va ser el model de ratolí humanitzat YG8R. Aquest ratolí de la soca C57Bl6, es trobava en un fons genètic *knock-out* (KO) pel gen endogen murí de la frataxina i s'havia rescatat amb un transgèn mitjançant un YAC que contenia dos còpies en tàndem del gen humà *FXN* amb 90 i 190 repeticions del triplet GAA, ambdós patològiques en l'intró 1 del gen. Aquest model de ratolí desenvolupat pel Dr. Mark Pook (Brunel University London), i adquirit a The Jackson Laboratory pretén mimetitzar els signes de l'atàxia de Friedreich. El ratolí presenta una afectació motora i sensitiva progressiva i moderada en comparació amb l'afectació en humans que és més severa, i neuropatologia en els DRG i la medulla espinal (192). En l'arribada a les nostres instal·lacions en el Centre d'Experimentació Animal de l'IGTP es van caracteritzar els animals a nivell genètic i es va determinar el genotipatge per tal de poder establir una colònia i obtenir el número d'animals adequats per poder realitzar l'estudi de teràpia gènica.

1.1. Genotipatge.

1.1.1. *Fxn* endogen murí.

Per tal de comprovar que els ratolins YG8R són KO per ambdós al·lels del gen *Fxn* murí, i per tant incapaçs d'expressar la proteïna frataxina endògena del ratolí, es va amplificar per PCR l'al·lel WT i l'al·lel KO de *Fxn* utilitzant encebadors específics a partir d'ADN extret de la cua dels ratolins. Es va incloure com a controls un ratolí de tipus salvatge (WT), i un ratolí heterozigot pel gen endogen de la frataxina que contenia un al·lel WT i un al·lel KO i que es va obtenir del creuament entre un ratolí YG8R i un ratolí WT. L'electroforesi en gel d'agarosa al 2% va revelar la presència d'una única banda intensa de 520 pb en l'animal WT, corresponent a ambdós al·lels WT per la frataxina endògena. El ratolí heterozigot va presentar dues bandes, una de 520 pb i l'altra de 245 pb, corresponent als al·lels WT i KO respectivament. Els ratolins YG8R no van mostrar cap banda a 520 pb, únicament una banda a 245 pb, amb la mateixa intensitat entre els dos animals, la qual cosa va confirmar que els ratolins es trobaven en un fons genètic KO per ambdós al·lels del gen *Fxn*, i per tant no expressaven la proteïna frataxina murina, de manera que l'única proteïna frataxina que s'expressava en l'animal era la provinent del transgèn humà (**Figura 26**).

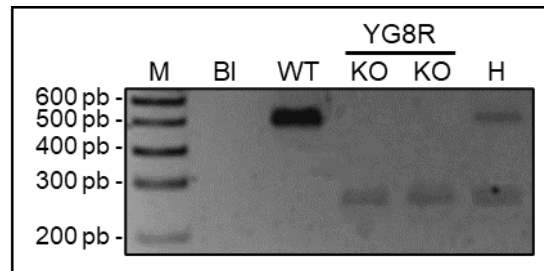


Figura 26. Determinació del fons genètic *knock-out* dels ratolins YG8R. Imatge de l'electroforesi en gel d'agarosa de la PCR realitzada a partir de d'ADN extret de la cua del ratolí. Cada carril correspon a una ratolí diferent. M: marcador de mida *Hyperladder I*; BI: blanc (Sense ADN de ratolí); WT: tipus salvatge; KO: *knock-out*; H: heterozigot. Les bandes corresponen al fragment amplificat de l'al·lel WT del gen *Fxn* murí (520 pb), i l'al·lel KO del gen *Fxn* murí (245 pb).

1.1.2. Quantificació del número de còpies del transgèn.

En els creuaments entre ratolins YG8R hemizigots la descendència que es podia obtenir sempre es mantenia en un fons genètic KO per la frataxina endògena murina, de manera que únicament es diferenciaven els ratolins en el número de còpies del transgèn amb la frataxina humana que poden tenir. Per tant, es podien obtenir ratolins amb tres possibles genotips, ratolins YG8R homozigots (YG8R Tg/Tg), amb dues còpies del transgèn, una a cada cromosoma, i per tant 4 còpies del gen humà *FXN*; ratolins YG8R hemizigots (YG8R Tg/-), amb una còpia del transgèn, i 2 del gen humà *FXN*; i ratolins amb cap còpia del transgèn. D'aquests, els que no contenien cap còpia del transgèn, no arribaven a néixer degut a que morien durant el desenvolupament embrionari com a conseqüència de la falta total de frataxina.

Per diferenciar els ratolins YG8R hemizigots (Tg/-) pel transgèn, dels homozigots (Tg/Tg), es va posar a punt la quantificació relativa del número de còpies del transgèn mitjançant PCR quantitativa a temps real (qPCR) amb SYBR green, a partir de mostres d'ADN extretes de la cua dels ratolins i amb encebadors dissenyats per amplificar únicament una regió del gen humà de frataxina, però no del gen *Fxn* de ratolí. El gen *FXN* humà i *Fxn* de ratolí tenen una alta identitat en les regions codificants, però aquesta similitud disminueix en les regions no codificants com els introns. És per això que els encebadors es van dissenyar per amplificar una regió de 102 pb de l'intró 1 del gen *FXN* humà, que no contenia el gen *Fxn* de ratolí. Com a control intern es va utilitzar una regió de l'apolipoproteïna B X-100 (74 pb) que és estable en quant a número de còpies i va permetre normalitzar els valors obtinguts de la quantificació del transgèn. Els valors de cada ratolí es van comparar amb els valors de ratolins YG8R hemizigots de genotip conegut que es van utilitzar com a control.

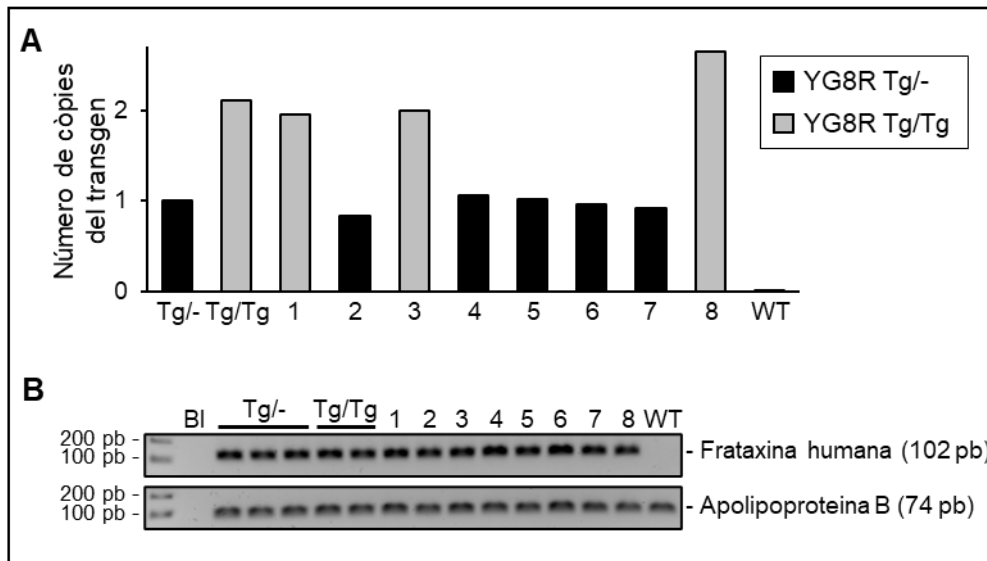


Figura 27. Quantificació del número de còpies del transgèn amb el gen humà *FXN* en el ratolí YG8R.

A) Representació de la quantificació del número de còpies del transgèn de diferents ratolins (1-8) per qPCR. Els valors de cadascun dels ratolins es van comparar amb la mitjana de tres ratolins control YG8R hemizigots (Tg/-) de genotip conegut, la qual es va normalitzar a 1 que és el número de còpies de transgèn que contenen. Com a controls es van incloure 2 mostres de genotip conegut de ratolins YG8R homozigots (Tg/Tg) i un ratolí WT. **B)** Electroforesi dels resultats de la qPCR per comprovar l'eficiència de la tècnica i l'especificitat dels encebadors per amplificar el fragment del gen de la frataxina humana del transgèn (102 pb) i del gen de l'apolipoproteïna B endogen del ratolí (74 pb).

Les mostres dels ratolins 2, 4, 5, 6 i 7 van mostrar uns valors pròxims a 1, igual que els ratolins control Tg/-, i per tant es van definir com a YG8R hemizigots (Negre). En canvi, les mostres dels ratolins 1, 3 i 8 amb valors pròxims a 2 còpies del transgèn, es van definir com a YG8R homozigots (Tg/Tg). La mostra del ratolí WT que es va incloure com a control negatiu no va mostrar amplificació del gen *FXN* humà demostrant l'especificitat dels encebadors (**Figura 27**). D'aquesta manera, es va determinar el número de còpies del transgèn rutinàriament de tots els ratolins YG8R que es van utilitzar en aquest estudi.

1.1.3. Quantificació del número de repeticions GAA.

El número de repeticions del triplet GAA dins l'intró 1 del gen *FXN* té un paper fonamental en el silenciament transcripcional del gen, i en conseqüència en l'expressió de frataxina i la severitat de la patologia. El model de ratolí YG8R es va generar inicialment amb un transgèn amb dos còpies en tàndem del gen humà *FXN*, ambdós amb un número de repeticions patològiques GAA bial·lèliques de 90 i 190.

Amb l'objectiu de comprovar si els ratolins YG8R adquirits a The Jackson Laboratory contenien l'expansió del triplet GAA en els gens *FXN* del transgèn, es va realitzar una TP-PCR basada en

fluorescència a partir d'ADN extret de la cua i amb encebadors específics, dels quals un tenia un marcador de fluorescència. D'aquesta manera, com més repeticions GAA contenia el gen *FXN*, més senyal fluorescent es va emetre. Per poder comparar els resultats que es van obtenir en el ratolí YG8R, es van incloure mostres humanes d'ADN d'un individu sa no portador, sense cap al·lel amb l'expansió del triplet GAA; d'un individu afecte amb FRDA, i per tant, homozigot per l'expansió GAA; i també es va afegir una mostra d'ADN de ratolí WT, sense l'expansió GAA.

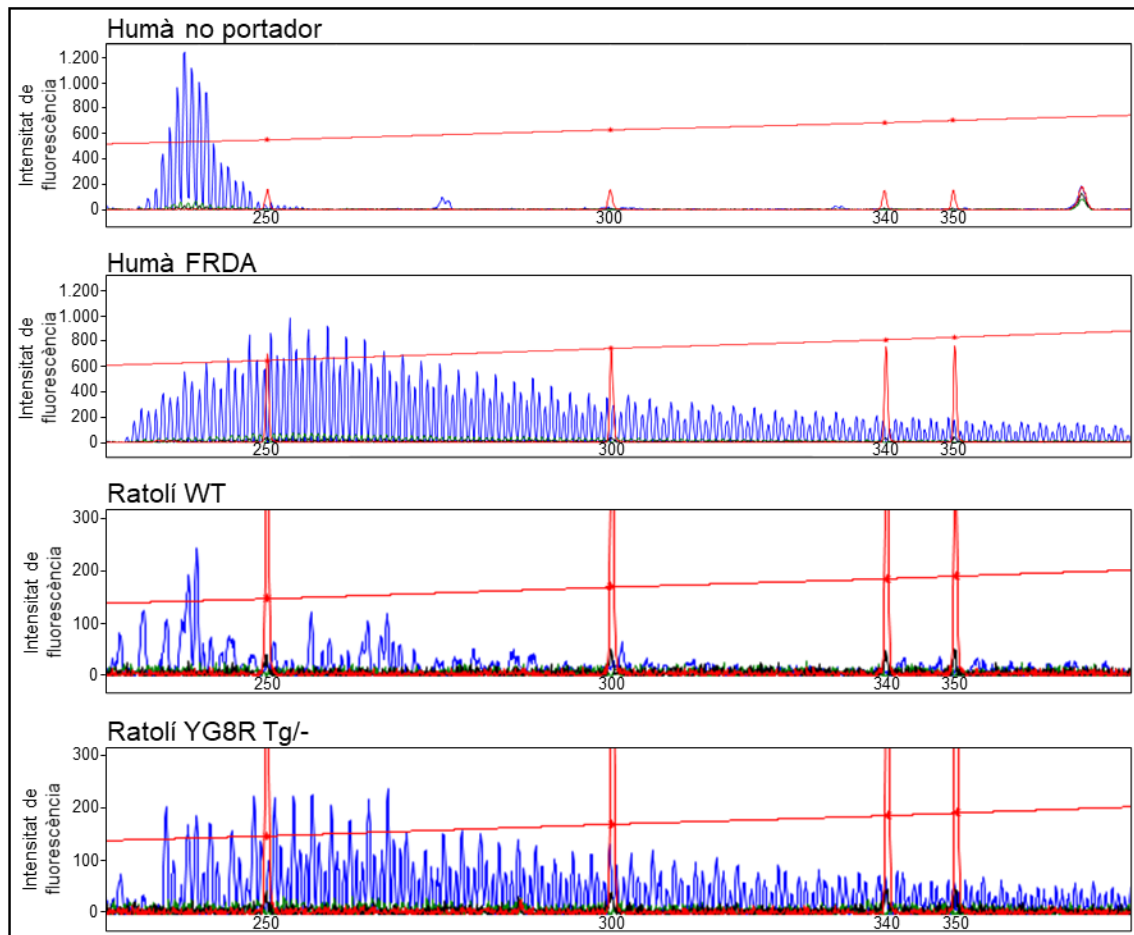
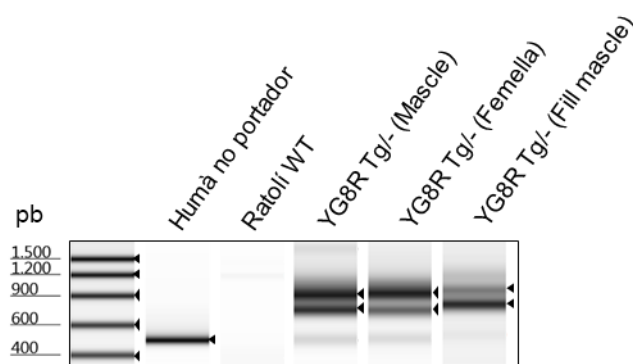


Figura 28. Anàlisi de l'expansió del triplet GAA en els ratolins transgènics YG8R mitjançant TP-PCR. Perfil dels pics de fluorescència de la TP-PCR d'un individu humà no portador, humà amb FRDA, ratolí WT i ratolí YG8R Tg^{-/-}. Cada pic fa referència a un triplet de repeticions GAA. Com més s'estén el perfil de pics, més llarga és la mida del producte de TP-PCR, i per tant més expansions GAA conté. Els pics en vermell fan referència al marcador estàndard de mida de 250, 300, 340, 350 pb. En l'eix ordenat es mostra l'escala arbitrària d'intensitat de fluorescència.

La mostra control humana de l'individu no portador i de ratolí WT van evidenciar un espectre de fluorescència similar, amb pocs pics, corresponents a l'absència d'una expansió llarga de repeticions GAA. En canvi, el ratolí transgènic hemizigot YG8R va mostrar el mateix patró d'espectre fluorescent que l'individu humà afecte d'atàxia de Friedreich, confirmant l'expansió del triplet de nucleòtids GAA en l'intró 1 del gen humà *FXN* (**Figura 28**).

Un cop es va confirmar l'existència de l'expansió patològica del triplet de repeticions GAA en el gen humà *FXN* dels ratolins YG8R, es va quantificar el número exacte de repeticions GAA que contenien en cadascun dels gens *FXN* en tàndem del transgèn per PCR i els resultats es van analitzar a través d'electroforesi capil·lar per determinar amb precisió la mida dels amplicons obtinguts. D'aquesta manera també es va poder determinar si els ratolins presentaven inestabilitat intergeneracional en el número de repeticions GAA. Segons The Jackson Laboratory els ratolins YG8R hemizigots, amb dues còpies del gen humà *FXN* contenien 90 i 190 repeticions GAA i en la PCR mostraven com a producte entre 3 i 4 bandes d'entre 800 i 1.100 pb en una electroforesi en gel d'agarosa. Però donada la inestabilitat intergeneracional que presenten les repeticions GAA, pot ser que aquestes haguessin incrementat o disminuït a mesura que es van anar creuant els ratolins per mantenir la colònia en les instal·lacions de The Jackson Laboratory.



Mostres	Mida dels amplicons (pb)		Número de repeticions GAA
Humà no portador	491		13
Ratolí humà	-		
YG8R Tg/- (Mascle reproductor)	682	966	77/172
YG8R Tg/- (Femella reproductora)	695	978	81/176
YG8R Tg/- (Fill mascle)	712	985	87/178

Figura 29. Quantificació del número de repeticions GAA del transgèn que contenen els ratolins YG8R. Electroforesi capil·lar de la PCR per determinar el número exacte de repeticions GAA. Es va incloure com a control positiu una mostra d'un individu humà sa no portador amb 13 repeticions GAA en homozigosi i una mostra de ratolí WT com a control negatiu que no conté el transgèn humà. Les fletxes en negre marquen les bandes de cada mostra.

Es van analitzar tres mostres de ratolins YG8R hemizigots, corresponents a un mascle reproductor, una femella reproductora i un mascle, fill dels anteriors. Com a control positiu de PCR es va afegir una mostra d'ADN d'un individu humà no portador amb 13 repeticions GAA en homozigosi. Com a control negatiu i per obtenir el mateix fons genètic es va afegir una mostra d'un ratolí WT, sense expansions GAA. Per quantificar el número de repeticions GAA a partir de

la mida de les bandes dels amplicons en l'electroforesi capil·lar, es va aplicar la fórmula $(X-450)/3$, on X va ser la mida de la banda de l'amplicó en pb; 450 són el número de nucleòtids de l'amplicó que flanquegen les repeticions GAA; i es va dividir entre 3 degut a que es tractava d'un triplet de nucleòtids repetits (**Figura 29**).

El resultat de l'electroforesi capil·lar va mostrar la presència de 3-4 bandes en els tres ratolins YG8R transgènics, dos d'elles amb més intensitat. En canvi, el ratolí WT no va presentar cap banda significativa, i la mostra humana de repeticions GAA conegudes, va evidenciar una banda de 491 pb tal com s'esperava, corresponent a 13 repeticions GAA. Per calcular el número de repeticions GAA es van seleccionar les dues bandes més intenses en els ratolins transgènics hemizigots YG8R. Després d'aplicar la fórmula, el mascle reproductor va mostrar 77/172 repeticions, la femella reproductora 81/176 i el fill mascle d'ambdós 87/178 repeticions GAA. Tal com es va observar en el patró de bandes, es va veure un lleuger increment en la mostra del ratolí fill, respecte als pares, possiblement degut a la inestabilitat intergeneracional (**Figura 29**).

Per tant, es va confirmar que els ratolins YG8R tenien expansions patològiques GAA dins l'intró 1 dels gens *FXN* del transgèn, que el número de repeticions del GAA era prop de 90 i 190 per cadascuna de les còpies del gen *FXN*, però en general una mica inferior al que s'havia descrit a The Jackson Laboratory, i que existeix inestabilitat intergeneracional, en aquest cas amb tendència a incrementar el número de repeticions GAA en la descendència, fet que podria generar més silenciament transcripcional, i per tant en aquesta es podria manifestar un fenotip més sever.

2. Generació de vectors d'expressió de la proteïna frataxina.

Amb l'objectiu de sintetitzar un vector viral adenoassociat recombinant per desenvolupar un tractament de teràpia gènica per a l'atàxia de Friedreich, inicialment calia dissenyar, generar i avaluar un constructe d'expressió que fos capaç d'expressar la proteïna frataxina humana en cèl·lules humanes i de ratolí, en uns nivells dins d'un rang que no fossin tòxics i amb potencial terapèutic per incrementar l'expressió de frataxina en cèl·lules deficientes, a uns nivells similars als no patològics que expressen endògenament les cèl·lules d'individus sans.

A l'hora de dissenyar el constructe d'expressió es va tenir en compte que la seqüència d'ADN per expressar la proteïna frataxina juntament amb el conjunt d'elements reguladors i les seqüències ITR dels AAV no podia excedir una mida més gran de 4,7 kb, degut a que era la capacitat màxima que es podia empaquetar en l'interior de la càpsida dels vectors virals adenoassociats (AAV). Aquesta limitació no va permetre incloure per tant el gen humà sencer de la frataxina, ja que feia aproximadament 80 kb, i es va descartar incloure alguns elements reguladors com per exemple la regió sencera promotora de la frataxina que en alguns articles s'havia determinat en aproximadament 5 kb. Per tant, es va optar per clonar la seqüència codificant d'ADN del transcrit

1 del gen *FXN* humà (*FXN*) en el plasmidi d'expressió pcDNA3.1. Aquesta seqüència codificant reduïda de *FXN*, de tant sols 630 pb, contenia les regions codificants dels exons 1a, 2, 3, 4a, 5a, i era capaç de sintetitzar la isoforma 1 de la proteïna frataxina humana, la qual era la forma canònica i més àmpliament expressada en els diferents teixits. Donada la seva petita mida, era adequada per a ser inclosa en el genoma d'un vector viral adenoassociat recombinant (rAAV) i així evitar la limitació de la mida màxima d'empaquetament. Tot i utilitzar un model experimental de ratolí per avaluar el tractament de teràpia gènica, es va utilitzar la seqüència codificant de frataxina humana i no la de ratolí, perquè la finalitat d'aquest estudi era generar un tractament de teràpia gènica que potencialment pogués aplicar-se a pacients humans amb atàxia de Friedreich.

Per poder diferenciar la frataxina recombinant del constructe d'expressió, de la frataxina endògena tant humana com murina de les cèl·lules, es va incloure mitjançant clonació, una seqüència d'ADN de 27 pb que codifiquen per l'hemaglutinina del virus *Influenza* (HA) en l'extrem 3' de la seqüència codificant de la *FXN*, en el mateix marc de lectura. De manera que al final de la seqüència de frataxina, es va eliminar el codó d'aturada natural de la frataxina, que determinava la finalització de la síntesi de proteïna, i es va col·locar l'etiqueta HA, situant el nou codó d'aturada al final d'aquesta. Aquesta seqüència HA es va situar en l'extrem 3' de la frataxina i no en l'extrem 5', perquè la proteïna frataxina quan es sintetitza, ho fa en una forma precursora, que madura sofrint 2 talls en la seqüència aminoacídica en l'extrem N-terminal realitzats per la peptidasa de processament mitocondrial (MPP) per entrar en la mitocondria. D'aquesta manera, es perden 80 aa en l'extrem N-terminal, quedant únicament en l'interior mitocondrial la forma madura, corresponent a la part C-terminal de 130 aa. Si es col·loqués l'HA en l'extrem N-terminal es perdria juntament amb els primers 80 aa de la seqüència precursora de la frataxina i s'acabaria degradant, fent impossible la seva detecció i diferenciació entre frataxina humana recombinant i endògena, ja que serien idèntiques. La seqüència d'ADN d'hemaglutinina té una mida petita, codifica per 9 aminoàcids, de manera que allarga la mida de la frataxina recombinant, permetent diferenciar-la de la frataxina endògena humana en estudis d'immunodetecció per una banda mitjançant l'ús d'un anticòs específic contra aquesta etiqueta HA, i per una altra banda, per mida de la proteïna, utilitzant un anticòs específic contra la proteïna frataxina en estudis de western-blot. Entre les diferents proteïnes que s'havien utilitzat com a etiqueta o gen reporter, com Flag, His, Cherry, GFP, V5, c-myc, etc.. es va seleccionar HA degut a la seva mida, de tant sols 9 aminoàcids, ja que d'aquesta manera era menys probable que s'alterés el plegament natural de la proteïna, permetent a la frataxina formar l'estructura terciària i desenvolupar la seva funció de manera eficient. S'obté doncs, una seqüència d'ADN capaç de codificar una proteïna frataxina humana recombinant amb una petita cua de 9 aminoàcids, que permet la immunodetecció específica amb un anticòs anti-HA d'aquesta frataxina provinent del constructe d'expressió i

distingir-la de la frataxina endògena humana i de ratolí en els estudis d'expressió per western-blot i immunohistoquímica.

Aquest plasmidi d'expressió inicial que contenia el promotor del citomegalovirus (CMV), la seqüència d'ADN codificant de FXN amb l'etiqueta HA i la senyal de poliadenilació de la hormona de creixement bovina (bGH PA) es va transfectar en cèl·lules embrionàries de ronyó humanes (HEK293) i de neuroblastoma de ratolí (N2a), i posteriorment se'n va avaluar la capacitat d'expressió de frataxina recombinant per western-blot. Utilitzant un anticòs específic anti-HA, per detectar l'epítip de l'hemaglutinina present únicament en la frataxina del plasmidi d'expressió, es va aconseguir detectar frataxina recombinant exclusivament en l'extracte proteic de les cèl·lules transfectades amb aquest plasmidi. En canvi, en l'extracte de cèl·lules transfectades amb un plasmidi buit no es va identificar la banda de la frataxina recombinant, per tant, es va comprovar que era específica (**Figura 30**).

Un cop es va confirmar la capacitat per expressar la proteïna frataxina recombinant de manera exitosa en cultius cel·lulars, es va anar modificant el constructe d'expressió afegint i canviant elements de regulació per tal d'obtenir una expressió de frataxina recombinant substancial, amb uns nivells d'expressió segurs, no tòxics i potencialment terapèutics similars als nivells d'expressió endògens de frataxina.

Al plasmidi pcDNA3.1 inicial amb el promotor viral CMV, la FXN amb l'HA i la bGH PA, se li va afegir l'element regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis de la marmota americana (WPRE), generant un nou plasmidi (**Figura 30A**). L'element WPRE, de 597 pb es va clonar en la part 3' de la seqüència codificant de frataxina, concretament a 83 pb després del codó d'aturada que estava just després de la seqüència codificant de HA i a 34 pb abans de la senyal de poliadenilació, de manera que no es traduïa a proteïna, però sí que es transcrivía, estant present en l'ARNm. S'ha vist que aquest element després de transcriure's en els plasmidis d'expressió, crea una estructura terciària que estabilitza la molècula d'ARNm, incrementant en conseqüència l'expressió de proteïna (505,574,575). Després de generar un plasmidi afegint aquest element regulador, se'n va generar un altre en el qual es va incloure la seqüència Kozak consens (**Figura 30A**). Aquesta petita seqüència de 8 pb (5'-CCGCCACC-3') que es troba present en la majoria d'ARNm dels gens en organismes eucariotes, en canvi, no es troba conservada en el gen endogen humà *FXN*. Tot i això, es va clonar just davant del codó d'inici de la seqüència codificant de FXN (ATG) ja que es tracta d'una seqüència que facilita el reconeixement de la seqüència d'iniciació en el ribosoma, orgànul encarregat de la traducció i síntesi proteica, i per tant incrementa l'eficiència de síntesis de la proteïna.

Aquests plasmidis generats es van transfectar en cèl·lules humanes HEK 293 i de ratolí N2a i seguidament es van analitzar mitjançant western-blot per avaluar l'efecte de cadascun dels elements reguladors introduïts en l'expressió de frataxina recombinant (**Figura 30B**).

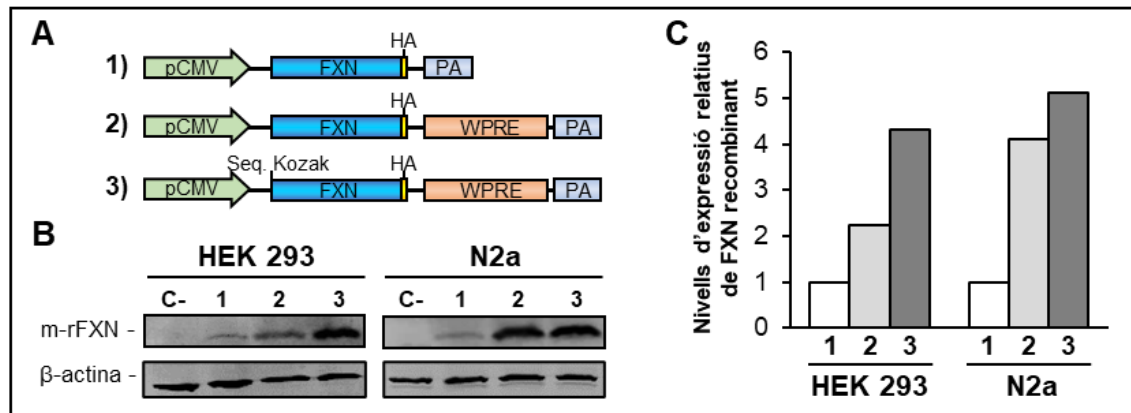


Figura 30. Efecte en els nivells d'expressió de frataxina recombinant dels elements reguladors WPRE i seqüència Kozak consens. **A**) Esquema dels constructes d'expressió amb FXN i els diferents elements reguladors que es van avaluar. **B**) Western-blot d'extracte proteic de cèl·lules HEK 293 i N2a transfectades amb vector d'expressió buit (C-) i amb els vectors mostrats en l'esquema A). La frataxina madura recombinant (m-rFXN) es va detectar amb l'anticòs primari específic HA. **C**) Quantificació dels nivells d'expressió relatius de proteïna frataxina recombinant. Es va establir el valor 1 als nivells d'expressió relatius del constructe 1. La β-actina es va utilitzar com a control de càrrega.

Els resultats de la quantificació dels nivells de proteïna obtinguts a partir de western-blot van demostrar que l'addició de l'element de regulació posttranscripcional WPRE incrementava l'expressió de frataxina recombinant entre 2,2 i 4,1 vegades. Mentre que l'addició de la seqüència Kozak consens, també va mostrar una millora de l'expressió en cèl·lules HEK 293 i N2a entre 1 i 2,1 vegades més que el plasmidi 2, a partir del qual es va afegir aquesta seqüència. Per tant, la inclusió d'ambdós elements en el constructe d'expressió va demostrar ser eficient per incrementar l'expressió de la proteïna frataxina recombinant en uns nivells substancials entre 4,3 i 5,1 vegades més que els nivells mostrats pel plasmidi 1 inicial. (**Figura 30C**).

Per tal de regular l'expressió de frataxina, es va avaluar la capacitat d'expressió que podien proveir diferents promotors. A partir del plasmidi amb el constructe d'expressió que contenia el promotor del citomegalovirus humà (CMV), la seqüència Kozak consens, la seqüència d'ADN codificant de frataxina juntament amb l'HA, l'element WPRE i la senyal de poliadenilació bGH PA, es va substituir únicament el promotor mitjançant tècniques de clonació, de manera que la resta d'elements reguladors es van mantenir. Es va generar doncs nous constructes d'expressió amb el promotor del gen humà de la fosfoglicerat quinasa 1 (PGK), el promotor neuronal específic del gen enolasa de rata (rNSE), el promotor del gen humà sinapsina 1 (SYN) i del promotor del

gen endogen humà de la frataxina (pFXN), tots ells mantenint la distància de 105 pb respecte l'inici de la seqüència d'ADN codificant de frataxina que tenia el promotor CMV (**Figura 31A**).

El promotor CMV és víric, constitutiu, ubic i d'elevada expressió. El promotor PGK també és constitutiu i ubic, però es va escollir perquè és humà i s'ha descrit que proveeix una expressió moderada i de llarga durada en cèl·lules de mamífer (521,522,576,577), i a més és metabòlic, ja que regula l'expressió de la proteïna fosfoglicerat quinasa 1, involucrada en el metabolisme energètic de la cèl·lula, la qual cosa, és important en aquest cas, degut a que en l'atàxia de Friedreich, les cèl·lules més afectades són aquelles amb un requeriment d'energia més elevat. Els promotors rNSE i SYN es van escollir perquè ambdós eren neuronals, i les principals cèl·lules diana on es pretenia aturar la degeneració i restablir el dany en la FRDA eren neurones, tant del SNC com SNP, les quals la seva neurodegeneració i mort causaven els signes neurològics característics de la patologia, per tant, justificava l'ús potencial d'aquest tipus de promotors neuronals per assegurar l'expressió en aquestes cèl·lules. Finalment, es va incloure una regió del promotor del gen humà *FXN*, concretament els 1.255 pb de la seqüència d'abans del codó d'inici del gen. Tot i no estar correctament descrit i haver-hi discrepàncies sobre com es regula el gen, s'havia descrit que 1.255 pb eren suficients per expressar el gen (120). Es va seleccionar el propi promotor de la frataxina, perquè podia proporcionar la regulació endògena adequada en cadascun dels tipus cel·lulars que es troben afectades en els diferents teixits.

Cadascun d'aquests constructes d'expressió generats amb els diferents promotors es van transfectar en cèl·lules N2a i HEK 293. Posteriorment, extractes de proteïna de les cèl·lules transfectades es van analitzar per western-blot i es va immunodetectar l'expressió de frataxina recombinant específicament amb l'anticòs HA (**Figura 31B**).

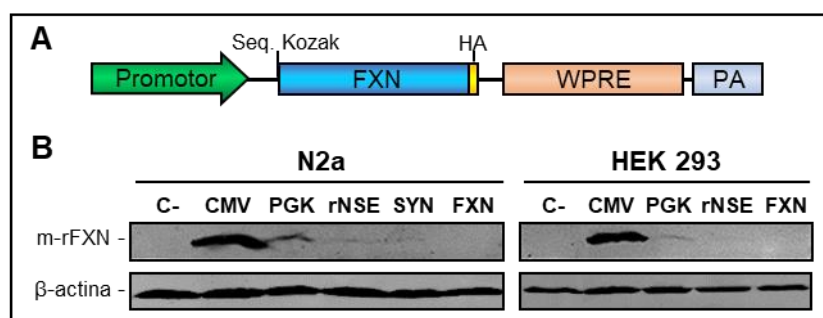


Figura 31. Avaluació dels nivells d'expressió de frataxina recombinant que proveeixen diferents promotors. **A)** Esquema del constructe d'expressió que es van avaluar. Tots contenen els mateixos elements, diferint únicament en el promotor. **B)** Western-blot dels constructes d'expressió per comparar l'expressió de frataxina recombinant que proveeixen els promotors viral del citomegalovirus (CMV), del gen humà fosfoglicerat quinasa 1 (PGK), l'específic neuronal del gen enolasa de rata (rNSE), del gen humà de la sinapsina 1 (SYN) i del promotor humà del gen endogen frataxina (FXN). Es va utilitzar com a control negatiu (C-) la transfecció d'un plasmidi buit, sense seqüència d'ADN codificant.

Les imatges del western-blot van revelar una forta expressió de frataxina recombinant amb el promotor viral CMV. A continuació, amb una expressió de frataxina més moderada el va seguir el promotor PGK. Els promotors neuronals rNSE i SYN van mostrar molt poca expressió de frataxina en les cèl·lules neuronals N2a, mentre que en les cèl·lules HEK, el promotor rNSE no va demostrar expressió de frataxina. No es va detectar expressió de frataxina amb la seqüència promotora del gen endogen de *FXN* en cap dels dos tipus cel·lulars (**Figura 31B**).

Per tant, donada la nul·la expressió del promotor endogen de frataxina, i la baixa expressió dels promotors neuronals rNSE i SYN, inclús en cèl·lules neuronals, es va descartar la seva inclusió en el constructe final d'expressió per produir el vector viral adenoassociat recombinant. Un altre argument per al qual es va descartar l'ús d'aquests promotors neuronals va ser degut a que l'atàxia de Friedreich no afecta exclusivament a neurones, sinó que es tracta d'una malaltia multisistèmica, que afecta a altres teixits i cèl·lules no neuronals, i totes les cèl·lules presenten deficiència de la proteïna, per tant, per desenvolupar un tractament de teràpia gènica era millor utilitzar un promotor constitutiu i ubic. D'aquesta manera, els promotors CMV i PGK, ambdós constitutius i ubics, van demostrar la capacitat per expressar frataxina en diferents tipus cel·lulars tant humans, com de ratolí de manera substancial.

Per determinar el promotor més adequat per regular l'expressió de frataxina recombinant i incloure'l en el constructe d'expressió final per produir els vectors virals adenoassociats recombinants, es va comparar l'expressió de frataxina recombinant que poden proporcionar els promotors humà PGK i viral CMV respecte els nivells d'expressió de frataxina endògena en cultius cel·lulars *in vitro* (**Figura 32A**). Per fer-ho es van transfectar dos tipus de cèl·lules humanes diferents, de neuroblastoma (SHSY-5Y) i de ronyó (HEK 293), amb vectors d'expressió idèntics, contenint la mateixa seqüència codificant de frataxina amb HA, i els mateixos elements reguladors com la seqüència Kozak, l'element WPRE, diferint únicament en el promotor. A banda, també es va transfectar un vector sense seqüència codificant, com a control negatiu d'expressió. Totes les cèl·lules es van cotransfectar amb un plasmidi que expressava la proteïna GFP, com a control d'eficiència de transfecció. Mitjançant western-blot de les cèl·lules transfectades homogeneïtzades es va detectar amb els anticossos primaris anti-HA, la frataxina recombinant, i anti-FXN, la frataxina recombinant i endògena de les cèl·lules (**Figura 32B**).

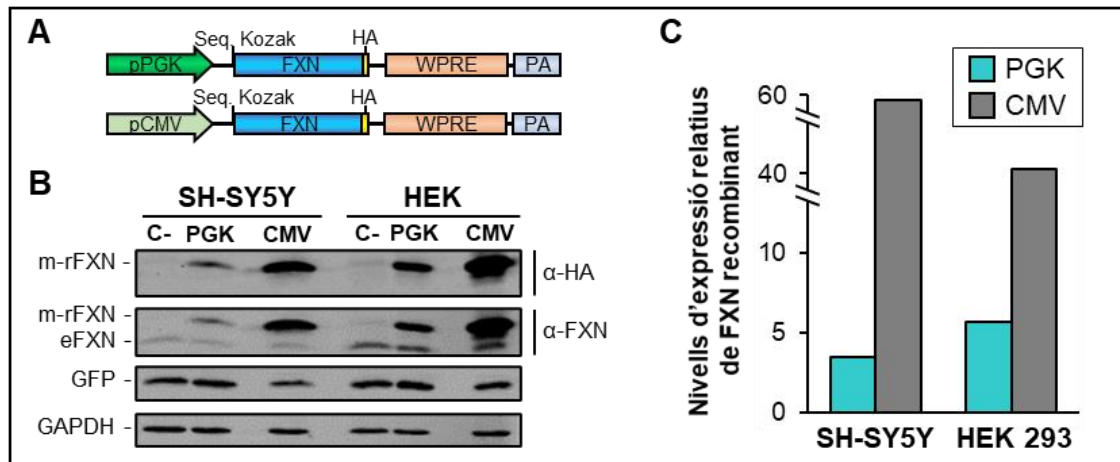


Figura 32. Comparació dels nivells d'expressió de proteïna frataxina recombinant proporcionats pels promotors PGK i CMV en cultius cel·lulars *in vitro*. **A)** Esquema dels constructes d'expressió amb FXN i els diferents elements reguladors. **B)** Western-blot d'extracte proteic de cèl·lules SH-SY5Y i HEK 293 transfectades amb vectors d'expressió buit (C-) i amb la seqüència codificant de FXN que contenen el promotor PGK i el promotor víric CMV. Es van utilitzar anticossos primaris contra HA i FXN per detectar la frataxina madura recombinant (m-rFXN) i la frataxina endògena (eFXN). **C)** Quantificació dels nivells d'expressió relatius de proteïna frataxina recombinant, respecte els nivells d'expressió endògens de frataxina de les cèl·lules. Es va establir el valor 1 als nivells d'expressió endògens de frataxina per cada tipus cel·lular. L'expressió de GAPDH es va utilitzar com a control de càrrega i així normalitzar els nivells d'expressió de frataxina. L'expressió de GFP es va utilitzar com a control d'eficiència de transfecció.

La quantificació dels nivells d'expressió de frataxina recombinant respecte els nivells endògens de frataxina en cada tipus cel·lular, va mostrar que el promotor PGK proporcionava uns nivells d'expressió de frataxina recombinant més pròxims als endògens, entre 3,4 i 5,7 vegades més. Mentre que el promotor viral CMV va demostrar ser molt potent, sobreexpressant entre 39,3 i 59,6 vegades més els nivells endògens en les cèl·lules analitzades (**Figura 32C**).

Veient els nivells de sobreexpressió de frataxina que aporta el CMV, i donat que s'havia descrit que la sobreexpressió de frataxina, superior a aproximadament 9 vegades els nivells endògens, causava toxicitat cel·lular (550). Sumat al fet que el promotor CMV, tot i ser constitutiu es silencia amb el temps en cèl·lules de mamífer degut a la metilació per ser un promotor viral, i per tant no pot proveir una expressió de llarga duració (402,515,519,529), es va descartar el seu ús per al tractament de teràpia gènica amb els vectors adenoassociats. En canvi, el promotor PGK que també és constitutiu i ubic, és humà, i va presentar uns nivells d'expressió de frataxina recombinant més similars als nivells endògens, que es trobaven dins d'un rang segur, no tòxic i potencialment terapèutic per desenvolupar una teràpia gènica per l'atàxia de Friedreich per tal d'incrementar els nivells deficientes de frataxina a uns nivells d'expressió no patològics.

3. Producció dels vectors virals adenoassociats recombinants (rAAV9).

Un cop avaluats cadascun dels constructes d'expressió amb els respectius elements de regulació per expressar la frataxina en uns nivells segurs, no tòxics, similars als endògens de les cèl·lules humanes i de ratolí, es va incloure mitjançant tècniques de clonació el constructe d'expressió comprès entre el promotor i la senyal de poliadenilació, en un plasmidi pAAV, per tal de flanquejar el constructe d'expressió per cada extrem, amb dues repeticions terminals invertides (ITR) del virus adenoassociat serotip 2 (AAV2), de 145 pb cadascuna, necessàries per la formació dels virions AAV recombinants i per l'establiment episomal del constructe d'expressió en el nucli de les cèl·lules transduïdes. Posteriorment es van sintetitzar els vectors virals adenoassociats recombinants serotip 9 (rAAV9) amb els constructes d'expressió mitjançant una triple transfecció en cèl·lules HEK 293 tal com es detalla en l'apartat 6 de materials i mètodes. Es van generar tres vectors virals rAAV9 (**Figura 33**).

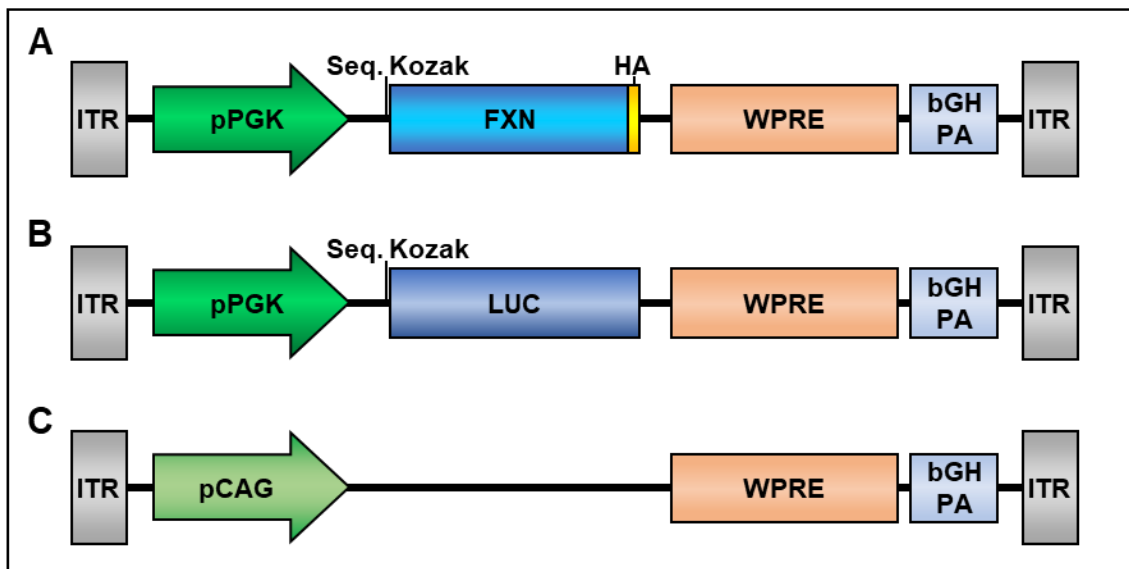


Figura 33. Representació esquemàtica dels constructes d'expressió dels vectors virals adenoassociats recombinants (rAAV9) generats. A) rAAV9-FXN. B) rAAV9-LUC. C) rAAV9-Null. ITR: Repeticions terminals invertides (145 pb); pPGK: Promotor humà del gen fosfoglicerat quinasa 1 (518 pb), seq. Kozak: Seqüència Kozak consens (8 pb); FXN: Seqüència d'ADN codificant del transcrit 1 de la frataxina humana (630 pb); HA: Seqüència de la hemaglutinina (27 pb); WPRE: Element regulador Posttranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota americana (597 pb); bGH PA: Senyal de poliadenilació de la hormona de creixement bovina (228 pb); LUC: Seqüència d'ADN codificant del gen luciferasa *firefly* de la cuca de llum (1653 pb); pCAG: Promotor híbrid sintètic basat en l'*enhancer* del promotor citomegalovirus (CMV) i el promotor de la β -actina de pollastre (584 pb).

El vector viral rAAV9-pPGK1-kFXN-HA-WPRE-bGHPA, abreviat **rAAV9-FXN**, que es va generar com a tractament per aplicar una teràpia gènica per l'atàxia de Friedreich, contenia el constructe d'expressió compost pel promotor humà del gen fosfoglicerat quinasa 1 (PGK), la

seqüència Kozak consens, la seqüència d'ADN codificant del transcrit 1 de la frataxina humana (FXN), la seqüència d'ADN de l'hemaglutinina del virus *Influenza* (HA) en el mateix marc de lectura que la FXN, l'element regulador posttranscripcional (WPRE), i la senyal de poliadenilació de la hormona de creixement bovina (bGH PA). Aquest constructe es va flanquejar per les repeticions terminals invertides (ITR) per a ser internalitzat en el virió rAAV9 (**Figura 33A**). El vector es va produir en un títol aconseguit de $1,4 \times 10^{13}$ gv/mL.

El vector viral rAAV9-pPGK1-LUC-WPRE-bGHPA, abreviat **rAAV9-LUC**, es va generar amb l'objectiu de conèixer la capacitat de transducció, tropisme i biodistribució dels vectors virals adenoassociats rAAV9, i la capacitat d'expressió que tenien els elements reguladors inclosos en el vector viral, mitjançant un estudi de bioluminescència *in vivo* en els ratolins. Per això, es va dissenyar el constructe d'expressió amb els mateixos elements reguladors que el vector rAAV9-FXN, substituint únicament la seqüència d'ADN codificant de FXN i HA per la seqüència d'ADN codificant del gen de la luciferasa *firefly* de la cuca de llum (*Photinus pyralis*). La proteïna luciferasa *firefly* té capacitat per emetre llum com a conseqüència de la seva reacció enzimàtica en presència del substrat luciferina, permetent establir una correlació entre la seva expressió i la detecció luminescent (**Figura 33B**). El títol viral obtingut va ser $9,8 \times 10^{12}$ gv/mL.

El vector viral rAAV9-pCAG-Null-WPRE-bGHPA, també anomenat en aquest estudi com vector control, buit o *null*, abreviat **rAAV9-Null**, es va anomenar d'aquesta manera perquè tot i incloure les seqüències ITR, i per tant tenir capacitat per formar la càpsida proteica del virió i transduir cèl·lules, no contenia seqüència codificant per cap proteïna. De manera que tot i tenir un promotor, en aquest cas el CAG, i l'element WPRE, aquest vector viral no tenia capacitat per sintetitzar cap proteïna recombinant. Per poder avaluar el tractament amb el vector rAAV9-FXN en els ratolins, es va generar aquest vector rAAV9-Null i es va utilitzar com a control d'injecció i d'administració de partícules virals. D'aquesta manera, tots els ratolins van patir el mateix procés d'injecció, amb la conseqüent cirurgia en la part dorsal de l'esquena, i van rebre l'administració de la mateixa quantitat o similar de partícules virals. Per tant doncs, les diferències que es van observar en els ratolins administrats amb el vector rAAV9-FXN van ser exclusivament degudes a l'expressió de la frataxina recombinant del transgèn (**Figura 33C**). El títol que es va obtenir per aquest vector viral va ser de 6×10^{12} gv/mL.

4. Disseny experimental per a l'avaluació del tractament de teràpia gènica en el model de ratolí YG8R amb atàxia de Friedreich.

Un cop generats els vectors virals adenoassociats recombinants rAAV9, es va definir el disseny experimental al llarg del temps que es va utilitzar per tal d'avaluar el tractament de teràpia gènica a nivell preclínic amb el vector rAAV9-FXN per prevenir i aturar la neurodegeneració i desenvolupament dels signes de l'atàxia de Friedreich en el model de ratolí YG8R. En aquest disseny, es van tenir en compte les característiques patològiques dels pacients amb atàxia de Friedreich, és a dir, l'edat d'inici de la malaltia, les cèl·lules i teixits que es trobaven principalment afectades i els símptomes clínics que es desenvolupaven. Aquests es van contrastar amb les característiques patològiques descrites en el model de ratolí, per tal de que la teràpia fos translacional i potencialment aplicable a humans.

Es van establir 3 grups de ratolins que es van administrar intratecalment amb vectors virals adenoassociats (rAAV9) per poder avaluar l'eficàcia del tractament de teràpia gènica. El grup de ratolins YG8R transgènics hemizigots administrats amb el vector rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN); el grup de ratolins YG8R transgènics hemizigots administrats amb el vector rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) com a grup control que desenvolupa la malaltia presentant un fenotip sensoriomotor i una patologia afectes; i el grup de ratolins WT administrats amb el vector rAAV9-Null (WT + rAAV9-Null) com a grup control sa, sense patologia (**Figura 34**).

Donat que es va descriure que la patologia en el model de ratolí YG8R s'iniciava aproximadament entre els 3 i 4 mesos d'edat dels ratolins (192), fet que significa que a aquesta edat ja existeix neurodegeneració i mort cel·lular, es van administrar els vectors virals adenoassociats (rAAV9) abans de l'aparició d'aquesta patologia, a les 10 setmanes d'edat. D'acord amb la bibliografia descrita (192,287–289), a aquesta edat, els ratolins mostraven un fenotip sensoriomotor normal i no tenien neurodegeneració ni mort cel·lular, de manera que els vectors rAAV9 podien transduir la totalitat de les cèl·lules, i sobretot neurones abans de que degeneressin, podent prevenir i aturar l'aparició de la malaltia. Els ratolins no es van administrar abans de les 10 setmanes d'edat, perquè l'administració intratecal requeria que tinguessin un mida mínima, amb la columna vertebral i l'espai intratecal desenvolupats, per poder realitzar la injecció entre les vertebres i poder administrar un volum més gran, sense comprometre la salut dels ratolins. Una injecció intratecal imprecisa o sobrepassar la capacitat tolerada de volum intratecal, podia incrementar la pressió del líquid cefalorraquidi, causant en ambdós casos danys severos en els ratolins (578).

Es va realitzar només una única administració de partícules virals AAV9 perquè per una banda, diversos estudis havien obtingut una llarga durada de l'expressió del gen terapèutic en diferents espècies, d'aproximadament entre 6 - 10 anys, sense la necessitat de realitzar una readministració (484–488). I d'altra banda, perquè si s'hagués realitzat més d'una administració podria haver

causat la reducció de l'eficàcia de la teràpia i haver desenvolupat una reacció inflammatòria amb repercussions negatives per als ratolins, degut a una resposta immunitària per exposició repetida al mateix antigen, en aquest cas, el de les proteïnes de la càpside viral.

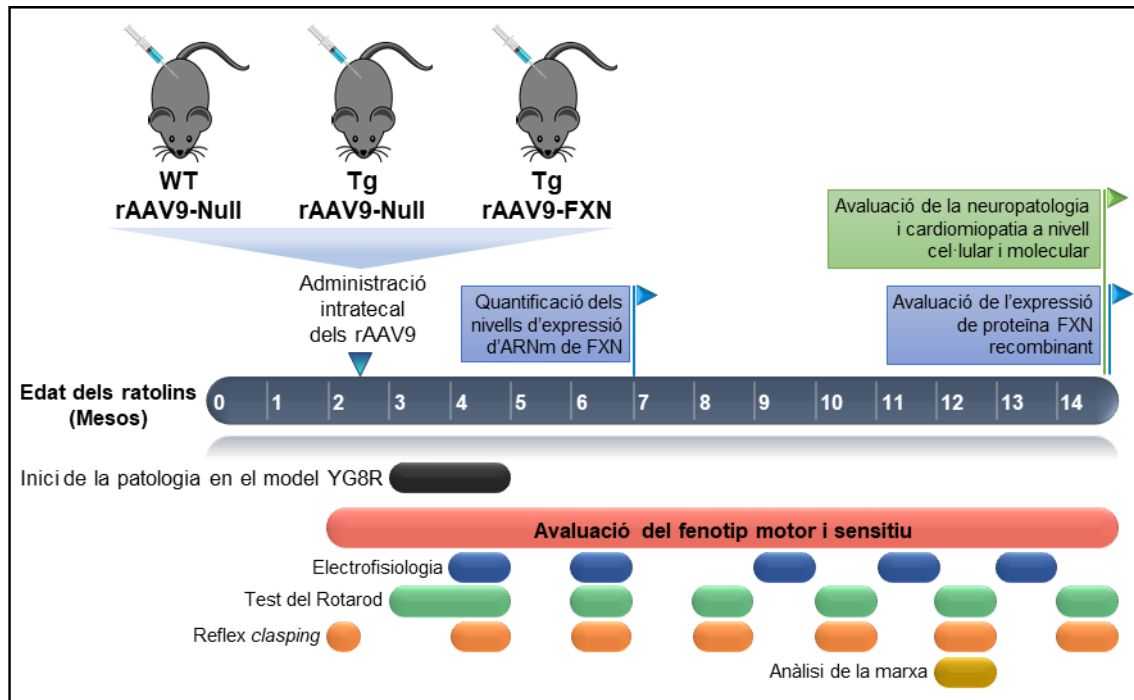


Figura 34. Disseny experimental per l'avaluació del tractament de teràpia gènica en el model de ratolí YG8R amb atàxia de Friedreich. La barra en blau del centre mostra l'edat dels ratolins durant l'estudi. La fletxa blava mostra l'edat d'administració dels vectors virals rAAV9 i els tres grups de ratolins (WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN) que es van analitzar en aquest estudi. La barra negra indica l'edat d'inici de la patologia en el model de ratolí YG8R. Les barres de diferents colors de la part inferior indiquen l'edat en que es realitzen cadascun dels tests de comportament per avaluar el fenotip motor i sensitiu dels ratolins. Les banderes indiquen els 7 i 14 mesos d'edat dels ratolins, en les quals alguns es van sacrificar per l'extracció de teixits i posterior avaluació de l'expressió de frataxina recombinant (blau) i avaluació de la neuropatologia i cardiomiopatia a nivell cel·lular i molecular (verd).

Un cop administrats els ratolins, després de deixar-los dos setmanes en repòs per recuperar-se de la cirurgia realitzada durant la injecció dels vectors virals adenoassociats (rAAV9), els ratolins pertanyents als 3 grups es van analitzar fenotípicament de manera periòdica al llarg del temps realitzant una sèrie de tests de comportament fins un any després de l'administració, és a dir, als 14 mesos d'edat de l'animal. Alguns ratolins als 7 mesos d'edat i la resta a 14 mesos d'edat es van sacrificar per poder extreure els seus teixits i analitzar-los per avaluar l'expressió de frataxina recombinant del vector rAAV9-FXN, mitjançant la quantificació dels nivells d'ARNm i proteïna frataxina, i es va avaluar la neuropatologia i la cardiomiopatia característiques de l'atàxia de Friedreich a nivell estructural, morfològic i molecular de les cèl·lules dels diferents teixits dels ratolins (**Figura 34**).

Capítol III: Avaluació de la biodistribució i expressió de frataxina que proveeix una administració intratecal del vector rAAV9-FXN en ratolins YG8R.

1. Anàlisi de la biodistribució dels vectors virals rAAV9 en ratolins amb una única administració intratecal.

Si bé es va comprovar que els elements reguladors inclosos en el vector viral AAV9 tenien capacitat per expressar la proteïna frataxina recombinant en cultius cel·lulars *in vitro* tant en cèl·lules humanes com de ratolí mitjançant la transfecció amb plasmidis d'expressió, no es va comprovar la capacitat per expressar frataxina del constructe d'expressió un cop generats els vectors virals adenoassociats rAAV9. S'havia descrit que els vectors AAV, incloent el serotip 9, tenien eficiència per transduir les cèl·lules d'organismes *in vivo*, però que no eren hàbils per transduir cèl·lules en cultius cel·lulars *in vitro* (579). Per tant, els resultats obtinguts de comprovar la capacitat de transducció dels AAV9 i d'expressió de frataxina en cultius cel·lulars *in vitro* no serien representatius, s'obtindria un percentatge de cèl·lules transduïdes molt baix, i en conseqüència una expressió de frataxina molt baixa.

Per aquest motiu, previ a l'inici de l'administració de ratolins amb els vectors virals rAAV9-FXN del tractament, es va realitzar un estudi de bioluminescència *in vivo*, per tal de conèixer la capacitat de transducció, tropisme i biodistribució dels vectors virals adenoassociats rAAV9 generats, i la capacitat d'expressió que tenen els elements reguladors inclosos en el vector viral en cèl·lules *in vivo* dels diferents teixits del model de ratolí YG8R amb una administració intratecal. D'aquesta manera, es va poder realitzar un estudi d'expressió i biodistribució *in vivo* ràpid, senzill i sensible, sense haver de sacrificar l'animal, extreure i processar els teixits per realitzar estudis de detecció de la frataxina amb anticossos específics mitjançant tècniques de western-blot o immunohistoquímica.

Per realitzar l'estudi de bioluminescència es va administrar un ratolí WT i YG8R transgènic hemizigot amb una sola injecció intratecal a les 10 setmanes d'edat amb el vector viral rAAV9-LUC. Es va utilitzar el vector viral adenoassociat rAAV9-LUC, que contenia els mateixos elements reguladors que el vector rAAV9-FXN, però amb la seqüència codificant de l'enzim luciferasa de la cuca de llum enlloc de la seqüència codificant de frataxina. D'aquesta manera, l'expressió de la proteïna luciferasa en presència del substrat luciferina, permetia realitzar una detecció luminescent en els ratolins, a través de l'emissió de fotons que es generaven com a producte de la reacció enzimàtica de la luciferasa amb el seu substrat luciferina

Tot i que no s'havia descrit neurodegeneració i mort neuronal en el model de ratolí YG8R a les 10 setmanes d'edat que era quan es van administrar els vectors virals rAAV9, es va comparar la capacitat de transducció, biodistribució i expressió del vector viral rAAV9-LUC administrant també intratecalment a les 10 setmanes d'edat, un ratolí WT control, sense neurodegeneració. D'aquesta manera, si els ratolins YG8R tinguessin alguna alteració patològica com

neurodegeneració respecte els WT a les 10 setmanes d'edat, impediria la transducció del vector viral en les cèl·lules ja mortes observant una falta d'expressió de luciferasa. També es va incloure com a controls negatius de luminescència un ratolí WT control sense administrar amb cap vector viral, i un ratolí YG8R administrat intratecalment amb el vector viral rAAV9-Null.

Les imatges adquirides en l'assaig de bioluminescència *in vivo* van mostrar únicament luminescència en els ratolins tant WT com YG8R administrats amb el vector rAAV9-LUC tant en posició prona com supina. Aquesta senyal luminescent es va detectar principalment en la zona central de tòrax i també la cua, el morro i les extremitats. Per altra banda, els ratolins WT no tractat i YG8R amb el vector rAAV9-Null, ambdós administrats amb el substrat luciferina no van mostrar luminescència (**Figura 35A i B**). D'aquesta manera es va demostrar l'eficiència de transducció dels vectors virals rAAV9 mitjançant una única administració intratecal en el ratolí *in vivo*, i es va confirmar la capacitat per expressar luciferasa dels elements reguladors inclosos en el vector viral. Malgrat això, la intensa senyal detectada en el tòrax dels ratolins va emascarar la detecció de senyal luminescent d'altres òrgans dels ratolins, de manera que no va permetre estudiar amb detall la biodistribució *in vivo* del vector viral rAAV9-LUC. Per exemple, amb aquest assaig de bioluminescència no es va poder determinar l'expressió de luciferasa en la medul·la espinal, que era el teixit més pròxim al lloc d'administració i de gran interès per ser dels primers en degenerar en l'atàxia de Friedreich, degut a que anatòmicament es localitza en la mateixa regió que el tòrax, fent que la intensa senyal luminescent no permeti la seva distinció.

Per tal d'estudiar la transducció dels vectors virals rAAV9-LUC en el cervell dels ratolins YG8R administrats es van adquirir imatges focalitzades del cap dels ratolins, discriminant el tòrax per evitar la saturació de la senyal luminescent, i així permetre incrementar el temps d'exposició. Es va detectar luminescència en la zona del crani únicament en el ratolí administrat amb el vector rAAV9-LUC, cosa que suggeria la transducció dels rAAV9-LUC i en conseqüència expressió de luciferasa en el cervell dels ratolins YG8R. Tot i això, no es va poder determinar amb exactitud si la senyal luminescent provenia de tot el cervell o únicament d'una part específica degut a la proximitat dels demés teixits adjacents (**Figura 35C**).

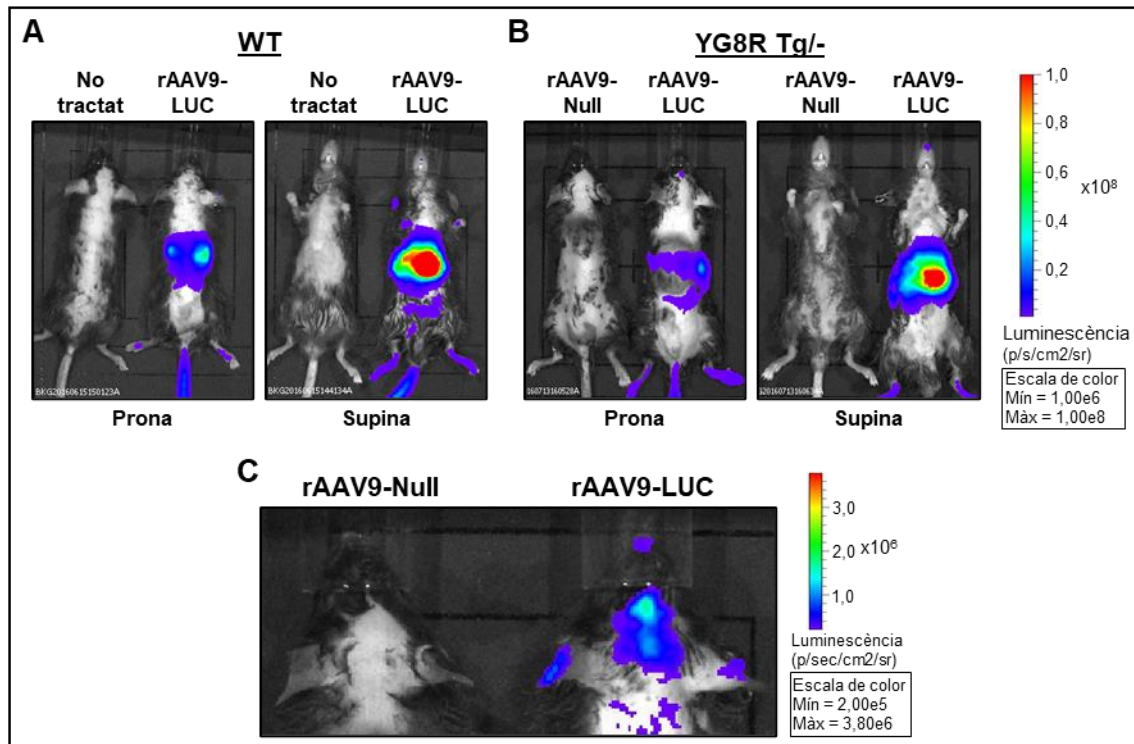


Figura 35. Expressió i biodistribució *in vivo* dels vectors virals rAAV9 administrats intratecalment en ratolins. A) Assaig de bioluminescència *in vivo* d'un ratolí control WT no administrat amb vector rAAV9 (no tractat) i un ratolí administrat amb el vector rAAV9-LUC. B) Assaig de bioluminescència *in vivo* de ratolins YG8R transgènics hemizigots (YG8R Tg^{-/-}) administrats un amb el vector buit rAAV9-Null i un amb el vector rAAV9-LUC. Les fotos es van adquirir per ambdós en posició prona i supina. C) Anàlisi de l'expressió de luciferasa en el cap dels ratolins YG8R administrats un amb el vector buit rAAV9-Null i un amb el vector rAAV9-LUC. Els ratolins es van analitzar 2 mesos després de l'administració intratecal dels vectors rAAV9. Els fotons emesos de la reacció de l'enzim luciferasa per metabolitzar el substrat D-luciferina es van detectar i expressar en color en les imatges amb unitats de luminescència (p/sec/cm²/sr). Els nivells d'expressió alts de luciferasa es van mostrar en vermell i els baixos en blau.

Per poder analitzar més detalladament la biodistribució del vector viral, es va realitzar un assaig de bioluminescència *ex vivo*. Es van eutanasiar els animals i es van extreure els òrgans ràpidament, per evitar la degradació proteica i mort cel·lular, i es va analitzar la bioluminescència de cadascun d'ells de manera separada. Es va detectar fotons i per tant expressió de luciferasa en tots els teixits analitzats, en el fetge, el cervell, la columna vertebral, el cor, pàncreas, múscul esquelètic gastrocnemi, pulmons, ronyó, còlon i melsa, tant en el ratolí WT com YG8R administrats amb el vector rAAV9-LUC. La intensitat dels fotons es va veure molt més elevada en el fetge que en els altres òrgans. Aquest es trobava en una escala de luminescència de $\times 10^7$ p/sec/cm²/sr, mentre que la resta d'òrgans van mostrar una luminescència de $\times 10^5$ p/sec/cm²/sr. Per tant, la forta senyal bioluminescent del tòrax dels ratolins en l'estudi *in vivo* provenia del fetge (Figura 36).

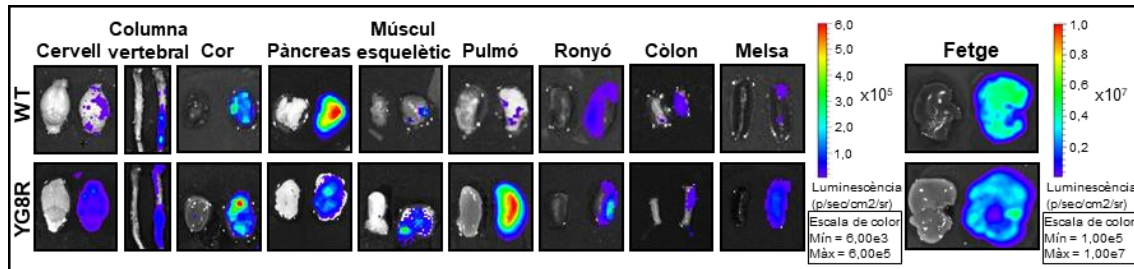


Figura 36. Expressió i biodistribució *ex vivo* dels vectors virals rAAV9 en els òrgans de ratolins administrats intratecalment. Assaig de bioluminescència *ex vivo* dels òrgans de ratolins WT (Panell superior) i YG8R (Panell inferior) 2 mesos després de l'administració intratecal dels vectors rAAV9. L'òrgan esquerra era d'un ratolí control, no administrat amb rAAV9 en el WT, i administrat amb vector buit rAAV9-Null en el YG8R. L'òrgan de la dreta en ambdós panells WT i YG8R es va administrar intratecalment amb el vector rAAV9-LUC a les 10 setmanes d'edat. Els fotons emesos de la reacció de l'enzim luciferasa per metabolitzar el substrat D-luciferina es van detectar i expressar en color en les imatges amb unitats de luminescència (p/sec/cm²/sr). Els nivells d'expressió alts de luciferasa es van mostrar en vermell i els baixos en blau.

El ratolí WT i el YG8R administrats amb rAAV9-LUC van mostrar la mateixa biodistribució, tenint expressió de luciferasa en tots els òrgans analitzats. Tot i això, quan van ser analitzats amb el mateix temps d'exposició i ajustats a la mateixa escala de luminescència, a excepció del fetge, es va veure diferències en la intensitat de luminescència en alguns òrgans, sobretot cervell, pàncreas i pulmons.

Donat que en l'atàxia de Friedreich els primers teixits que degeneren i que causen els signes fisiopatològics característics de la malaltia com l'atàxia i la neuropatologia sensitiva són els teixits del sistema nerviós, es va analitzar específicament la biodistribució i expressió de la medul·la espinal i el cervell, cerebel i tronc cerebral dels ratolins YG8R administrats amb els vectors virals rAAV9-LUC. Es va aïllar la medul·la espinal de la columna vertebral i el conjunt cervell, cerebel i tronc cerebral del crani per tal d'obtenir més sensibilitat de senyal. Es va detectar expressió de luciferasa per tota la medul·la espinal del ratolí YG8R administrat amb el vector rAAV9-LUC, però especialment més elevada en la regió cervical i lumbar (**Figura 37A**). En el conjunt de cervell, cerebel i tronc cerebral es va detectar en general expressió de luciferasa, però per discernir millor les zones d'emissió luminescents, es van separar els teixits en tres seccions, cervell, cerebel i tronc cerebral, confirmant la detecció de luminescència en totes elles, però de manera més elevada en el còrtex cerebral i tronc cerebral, i molt més baixa en el cerebel (**Figura 37B**).

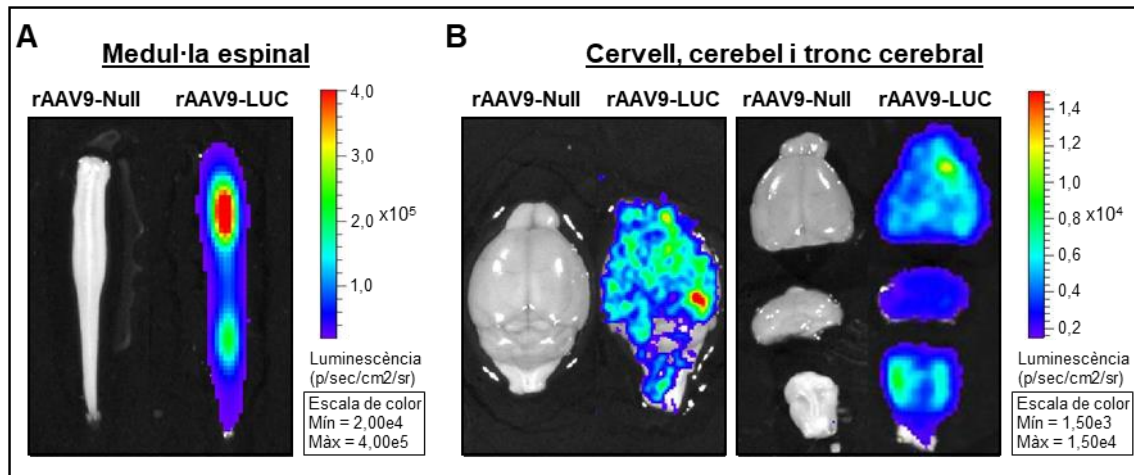


Figura 37. Avaluació de la biodistribució i expressió de luciferasa en teixits del sistema nerviós central de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-LUC. A) Medul·la espinal de ratolins YG8R administrat un amb rAAV9-Null i un amb rAAV9-LUC. B) Cervell, cerebel i tronc cerebral junts i separats, de ratolins YG8R administrat un amb rAAV9-Null i un amb rAAV9-LUC. Els fotons emesos de la reacció de l'enzim luciferasa per metabolitzar el substrat D-luciferina es van detectar i expressar en color en les imatges amb unitats de luminescència (p/sec/cm²/sr). Els nivells d'expressió alts de luciferasa es van mostrar en vermell i els baixos en blau.

La medul·la espinal va mostrar una expressió de luciferasa més elevada que el conjunt cervell, cerebel i tronc cerebral, degut principalment a que els vectors rAAV9 es van injectar en el líquid cefalorraquidi en la zona lumbar de la columna vertebral, i per tant va ser el teixit més pròxim al lloc d'administració. Tot i això, els vectors rAAV9 van mostrar la capacitat per difondre pel líquid cefalorraquidi i transduir les cèl·lules del conjunt cervell, cerebel i tronc cerebral, demostrant una ampla biodistribució pel sistema nerviós central i una expressió robusta de luciferasa.

2. Avaluació de l'expressió de frataxina recombinant en ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

Un cop confirmada la capacitat de transducció dels vectors virals rAAV9 en els ratolins YG8R transgènics realitzant una administració intratecal i la capacitat per expressar proteïna dels elements reguladors inclosos en els rAAV9 generats mitjançant l'assaig de bioluminescència *in vivo* i *ex vivo* amb la luciferasa, es va avaluar detalladament l'expressió de frataxina recombinant en ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN als 7 i 14 mesos d'edat dels animals, és a dir, als 5 mesos i 12 després de la injecció. Es va quantificar els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina i els nivells d'expressió i biodistribució de frataxina recombinant en diferents teixits dels ratolins. Per poder realitzar aquesta avaluació de l'expressió de frataxina, es

van sacrificar els ratolins per tal d'extreure'n els teixits, que van ser processats de la manera corresponent per cadascuna de les tècniques utilitzades.

2.1. Quantificació dels nivells d'ARNm de frataxina.

En primer lloc, per tal de conèixer si els ratolins YG8R administrats intratecalment amb els vectors virals rAAV9-FXN eren capaços d'expressar ARNm de frataxina recombinant, i per tant, realitzar la transcripció de la seqüència d'ADN codificant de FXN humana, es va detectar i quantificar mitjançant PCR quantitativa a temps real amb retrotranscripció (qRT-PCR) únicament els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina humana recombinant en diferents teixits de ratolins administrats amb rAAV9-FXN als 7 mesos d'edat.

Per amplificar únicament l'ARNm de frataxina humana recombinant del vector rAAV9-FXN, i no la frataxina humana del transgèn del ratolí YG8R, les quals eren idèntiques, es van dissenyar encebadors i sonda específicament en la única regió en que es diferenciaven, que era la seqüència de la hemaglutinina (HA) que s'havia inclòs precisament per poder diferenciar-les. D'aquesta manera, l'encebador *forward* es va dissenyar en l'exó 5a de la frataxina, comú tant en la seqüència d'ARNm del transgèn, com la recombinant del vector viral; l'oligonucleòtid marcat amb una sonda Taqman també es va dissenyar en l'exó 5a; i l'encebador *reverse* en la seqüència HA, present únicament en l'ARNm recombinant de frataxina (**Figura 38A**).

Es va avaluar l'expressió d'ARNm de frataxina recombinant en la medul·la espinal lumbar, fetge, DRG lumbar, el còrtex frontal del cervell, cerebel i medul·la espinal toràctica de ratolins YG8R transgènics hemizigots administrats amb el vector rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) i ratolins YG8R transgènics hemizigots administrats amb el vector rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN).

Els resultats obtinguts de la qRT-PCR van mostrar que únicament els ratolins Tg + rAAV9-FXN tenien expressió d'ARNm de frataxina recombinant, i que aquesta es detectava en tots els teixits analitzats. En canvi, no es va detectar ARNm de frataxina recombinant en cap dels teixits dels ratolins Tg + rAAV9-Null. Addicionalment, per tenir una comparació de la biodistribució i dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina recombinant entre teixits dels ratolins Tg + rAAV9-FXN, es van comparar els valors expressats en cada teixit respecte els valors obtinguts en la medul·la espinal lumbar, que es va agafar com a valor de referència i es va normalitzar a 1, perquè era el teixit més pròxim al punt d'administració dels rAAV9, i va demostrar ser el teixit amb més expressió d'ARNm de frataxina recombinant. A aquesta li va seguir el fetge amb un valor d'expressió relatiu de 0,72 i a continuació amb uns nivells entre 0,27 i 0,37, els DRG lumbar, cervell, cerebel i medul·la espinal cervical (**Figura 38A**).

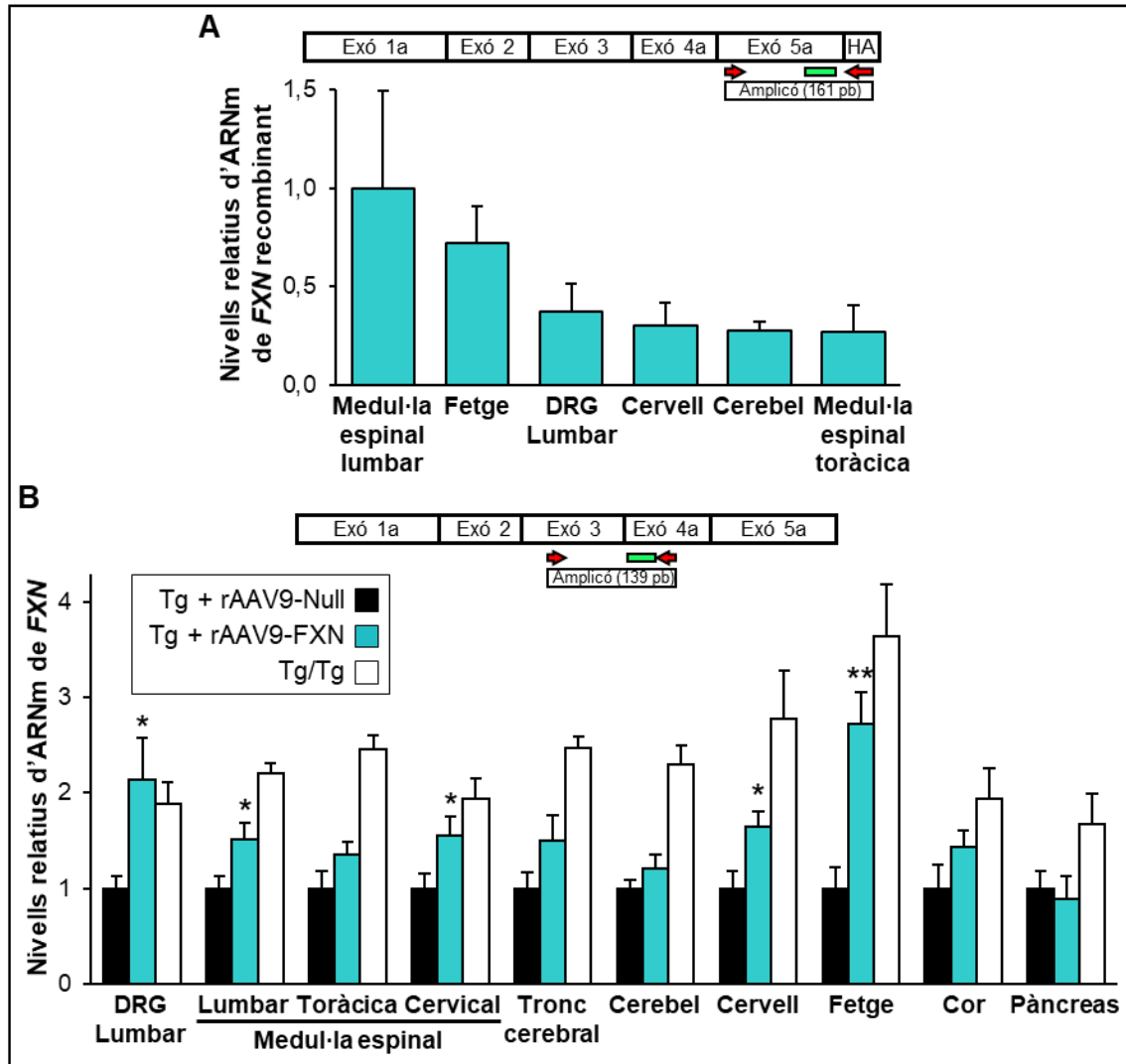


Figura 38. Quantificació relativa dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina humana en teixits de ratolins administrats amb vectors rAAV9. **A)** Quantificació dels nivells d'expressió relatius d'ARNm de frataxina recombinant de teixits dels ratolins YG8R hemizigots administrats amb el vector rAAV9-FXN als 5 mesos després de la injecció mitjançant qRT-PCR. Els valors d'expressió de frataxina recombinant de cada teixit es van normalitzar als nivells d'expressió de la medul·la espinal lumbar, que es va agafar com a referència. **B)** Quantificació dels nivells d'expressió relatius d'ARNm de frataxina total de teixits del sistema nerviós i sistèmics en ratolins YG8R hemizigots administrats intratecalment amb rAAV9-Null i rAAV9-FXN. Els valors es van normalitzar a la mitjana dels valors obtinguts pels ratolins Tg + rAAV9-Null per cada teixit, la qual es va assignar el valor 1. Els ratolins YG8R homozigots (Tg/Tg) es van incloure com a controls d'expressió elevada. A sobre de cada gràfica hi ha representada la localització dels encebadors (fletxes vermelles) i sonda (en verd) utilitzats per quantificar específicament l'ARNm de la frataxina humana recombinant **A)**, i frataxina humana total **B)**. Es va utilitzar l'expressió d'ARNm de beta-2-microglobulina (*B2m*) com a control intern. Per cada teixit es van analitzar 5 ratolins per grup. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

Un cop confirmada l'expressió d'ARNm de frataxina recombinant en els ratolins administrats amb el vector rAAV9-FXN, es van quantificar els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina humana total de diferents teixits dels sistema nerviós i teixits sistèmics mitjançant qRT-PCR per tal de conèixer l'efecte de l'administració del vector viral rAAV9-FXN en els nivells totals d'expressió d'ARNm de frataxina dels ratolins YG8R. En aquest cas, es van dissenyar encebadors específics en l'exó 3 i l'exó 4 de la seqüència de frataxina, per amplificar tots els transcrits descrits del gen *FXN* humà i que poden expressar els ratolins YG8R a partir del transgèn, i els transcrits provinents del vector viral rAAV9-FXN (**Figura 38B**).

Es van analitzar els ganglis de l'arrel dorsal lumbar (DRG), la medul·la espinal lumbar, toràcica i cervical separades, el tronc cerebral, el cerebel i el còrtex frontal del cervell com a teixits del sistema nerviós; i el fetge, el cor i el pàncreas com a teixits sistèmics. Els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina total dels ratolins Tg + rAAV9-FXN capaços d'expressar ARNm del transgèn humà de *FXN* i ARNm del ADNc de *FXN* recombinant provinent del vector viral rAAV9-FXN, es van comparar amb els nivells dels ratolins Tg + rAAV9-Null, que únicament expressaven ARNm de *FXN* humà del transgèn. Els valors dels ratolins Tg + rAAV9-Null es van agafar com a valor de referència i es van normalitzar a 1 per cada teixit. Es va afegir com a control d'expressió elevada d'ARNm de frataxina humana, teixits de ratolins YG8R transgènics homozigots sense administrar (Tg/Tg). Aquests ratolins contenien el doble de còpies del transgèn humà respecte els ratolins hemizigots, un total de 4 còpies del gen *FXN* en comparació amb les 2 dels ratolí hemizigots. Per tant, tenien capacitat d'expressar més quantitat d'ARNm de frataxina i en conseqüència tenien un fenotip i patologia molt menys severes.

En general, els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina total dels ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar-se més elevats en comparació amb els nivells dels ratolins Tg + rAAV9-Null en tots els teixits analitzats menys el pàncreas (**Figura 38B**). Aquest increment, degut a l'expressió d'ARNm de frataxina recombinant del vector rAAV9-FXN, va ser estadísticament significatiu en els DRG lumbar [$F_{(1,8)} = 6,023$, $P = 0,04$], la medul·la espinal lumbar [$F_{(1,8)} = 5,868$, $P = 0,042$] i cervical [$F_{(1,8)} = 5,896$, $P = 0,041$], el còrtex frontal del cervell [$F_{(1,8)} = 6,108$, $P = 0,039$] i el fetge [$F_{(1,8)} = 14,603$, $P = 0,005$]. Tant el fetge com els DRG lumbar van mostrar els valors d'expressió relatius més elevats, amb 2,7 i 2,1 respectivament, seguit de la medul·la espinal lumbar, cervical i cervell, amb valors d'expressió relatius entre 1,51 i 1,64 respecte el valor de referència 1 dels ratolins Tg + rAAV9-Null. Els ratolins Tg/Tg van expressar els valors d'expressió d'ARNm de frataxina total més elevats en tots els teixits pràcticament entre 2-3 vegades els valors d'expressió del ratolí Tg + rAAV9-Null. En els DRG lumbar, medul·la espinal cervical i fetge, els ratolins Tg + rAAV9-FXN van demostrar tenir uns valors similars als ratolins Tg/Tg. També va haver un augment dels nivells d'expressió de ARNm de frataxina total, tot i que no de manera significativa,

en la medul·la espinal toràctica [$F_{(1,8)} = 2,83, P = 0,131$], el tronc cerebral [$F_{(1,8)} = 2,219, P = 0,175$], el cerebel [$F_{(1,8)} = 2,039, P = 0,191$] i el cor [$F_{(1,8)} = 1,912, P = 0,204$] dels ratolins Tg + rAAV9-FXN en comparació amb els ratolins Tg + rAAV9-Null.

2.2. Biodistribució de l'expressió de proteïna frataxina recombinant.

Donada l'eficiència de transducció dels vectors rAAV9 i havent confirmat l'expressió de luciferasa i ARNm de frataxina recombinant en els diferents teixits de ratolins administrats, a continuació, per tal de saber si l'eficiència de transducció i expressió del vector rAAV9-FXN reflectia la biodistribució observada anteriorment en l'assaig de bioluminescència amb la luciferasa del vector rAAV9-LUC, es va analitzar l'expressió de la proteïna frataxina recombinant en teixits del sistema nerviós central i perifèric dels ratolins administrats intratecalment amb rAAV9-FXN.

Extractes totals de proteïna de medul·la espinal lumbar, DRG lumbar i toràcics, nervi ciàtic i fetge de ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-Null i rAAV9-FXN es van analitzar mitjançant western-blot. Per tal de detectar únicament la proteïna frataxina humana recombinant es va utilitzar un anticòs primari específic contra l'etiqueta HA (anti-HA), adherida a l'extrem C-terminal de la proteïna frataxina recombinant, i que no estava present en la proteïna humana del transgèn de ratolí. També es va utilitzar un anticòs específic contra la proteïna frataxina (anti-FXN), que va permetre detectar tant la forma madura (m-FXN transgèn, 14 kDa) i intermediària (i-FXN transgèn, 17 kDa) de la frataxina humana del transgèn de ratolí, com la forma madura de la frataxina recombinant del vector viral rAAV9-FXN (m-rFXN, 17 kDa).

En les imatges obtingudes per western-blot, la banda referent a la frataxina madura recombinant (m-rFXN) es va detectar amb ambdós anticòs específics HA i FXN, mostrant el mateix pes molecular i confirmant que marcaven específicament aquesta proteïna. La diferència en el pes molecular que es va observar en la frataxina humana recombinant (m-rFXN) respecte la frataxina humana del transgèn de ratolí (m-FXN transgèn) tot i ser la mateixa proteïna, va ser deguda als 9 aminoàcids de més de l'HA que contenia la frataxina recombinant del vector rAAV9-FXN, i que li aportava un pes molecular superior i per tant, va permetre distingir-la per mida en el western-blot, utilitzant l'anticòs anti-FXN. Malgrat això, la forma intermediària de la frataxina humana del transgèn del ratolí (i-FXN transgèn) va demostrar tenir el mateix pes molecular que la forma madura de la frataxina recombinant (m-rFXN) tal com es va observar sobretot en la medul·la espinal, que era on més es va expressar aquesta forma en els ratolins YG8R. Per tant, no es va poder diferenciar clarament per mida la forma intermediària de frataxina del transgèn de la forma madura recombinant en alguns teixits com la medul·la espinal lumbar, però si per exemple en DRG lumbar i toràcics. Tot i això, clarament es va observar que la banda dels ratolins

administrats amb rAAV9-FXN era més intensa que en els ratolins administrats amb rAAV9-Null, indicant l'expressió de la frataxina recombinant (**Figura 39**).

La detecció d'expressió de la forma madura de frataxina recombinant va indicar que la forma precursora de frataxina que era sintetitzada inicialment a partir del vector rAAV9-FXN realitzava el procés de maduració, era tallada per la peptidasa de processament mitocondrial (MPP), i entrava en la mitocòndria, tenint potencial per poder recuperar la funció mitocondrial afectada a les cèl·lules dels ratolins YG8R.

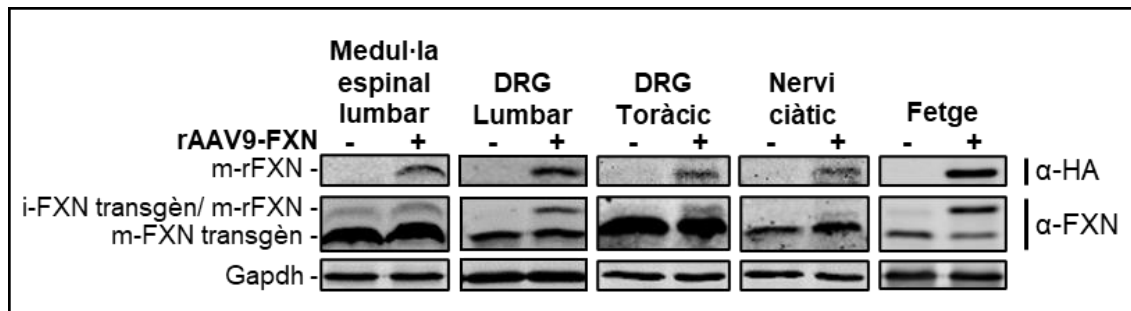


Figura 39. Biodistribució de l'expressió de frataxina recombinant en teixits de ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN. Es va avaluar l'expressió de frataxina recombinant en medul·la espinal lumbar, DRG lumbar i toràctics, nervi ciàtic i fetge de ratolins administrats o no amb el vector rAAV9-FXN mitjançant western-blot utilitzant dos anticossos primaris, anti-HA i anti-FXN. El símbol + o – sota el nom dels teixits indica si el ratolí es va administrar o no respectivament amb el vector rAAV9-FXN. m-rFXN indica la forma madura de la frataxina humana recombinant (17 kDa); i-FXN transgèn, indica la forma intermediària de la proteïna frataxina humana del transgèn del ratolí (17 kDa); m-FXN transgèn, indica la forma madura de la proteïna frataxina humana del transgèn del ratolí (14 kDa). L'expressió del Gapdh es va utilitzar com a control de càrrega (36 kDa).

Els resultats del western-blot van demostrar l'expressió de frataxina humana recombinant en tots els teixits analitzats únicament en les mostres de ratolí administrat amb rAAV9-FXN. En canvi, els teixits del ratolí administrat amb vector rAAV9-Null no van mostrar expressió de frataxina recombinant. Per tant, la injecció intratecal en la regió lumbar de la medul·la espinal per administrar els rAAV9-FXN en el líquid cefalorraquidi va demostrar una àmplia distribució dels vectors virals transduïnt cèl·lules i expressant la proteïna frataxina recombinant en teixits del sistema nerviós central com es va demostrar en la medul·la espinal, i també en el sistema nerviós perifèric com els DRG lumbar i toràctics i el nervi ciàtic, que són els primers teixits afectats en l'atàxia de Friedreich. L'expressió de frataxina recombinant en el fetge va demostrar que tot i administrar els vectors en el sistema nerviós central, aquests eren capaços de transduir teixits sistèmics confirmant la distribució que es va mostrar inicialment en l'assaig de bioluminescència, però aquest cop amb proteïna frataxina (**Figura 39**).

Per caracteritzar específicament a nivell cel·lular la biodistribució i l'expressió de frataxina recombinant en les neurones dels DRG lumbar, toràcics i cervicals de ratolins YG8R administrats amb el vector viral rAAV9-FXN als 7 mesos d'edat mitjançant immunohistoquímica, es va immunodetectar únicament la frataxina recombinant utilitzant l'anticòs específic contra l'etiqueta HA, i es va analitzar la reacció colorimètrica de l'enzim peroxidasa, que estava unit a l'anticòs secundari, degut a la seva reacció amb el seu substrat, generant com a resultat la coloració marronosa en aquelles cèl·lules que expressaven la frataxina recombinant.

Qualitativament, en les imatges obtingudes per microscòpia de les seccions tenyides dels DRG, es va veure expressió de frataxina recombinant en tots els DRG, lumbar, toràcics i cervicals dels ratolins administrats amb el vector rAAV9-FXN. En canvi, els ratolins YG8R administrats amb rAAV9-Null, no van mostrar coloració, i per tant no van expressar frataxina recombinant. Les imatges ampliades van mostrar una distribució de frataxina recombinant dins la cèl·lula en el citoplasma i segurament dins la mitocondria, però no en el nucli cel·lular (**Figura 40A**).

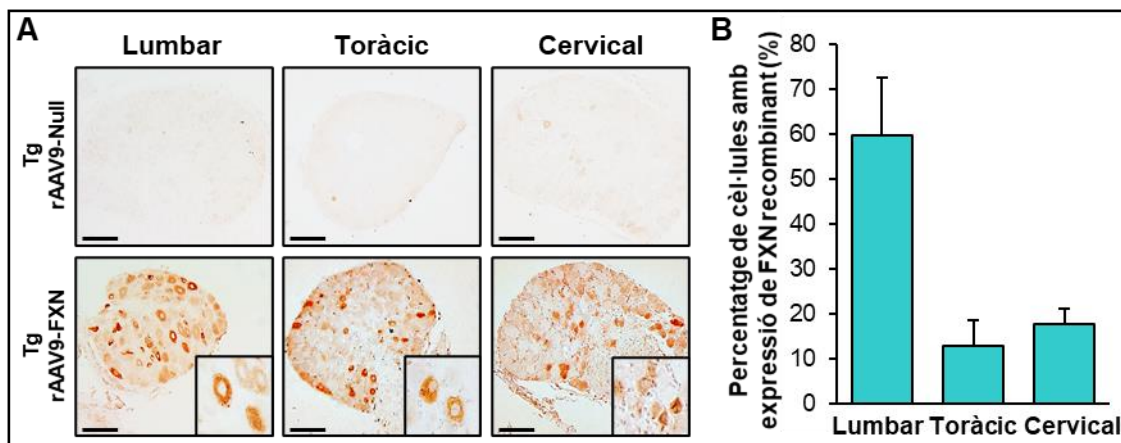


Figura 40. Expressió de frataxina recombinant en els DRG dels ratolins YG8R administrats. A) Imatges d'immunohistoquímica de seccions dels ganglis de l'arrel dorsal (DRG) lumbar, toràcics i cervicals d'un ratolí Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de 7 mesos d'edat. La frataxina recombinant es va immunodetectar específicament amb anticòs anti-HA. Les imatges ampliades mostren la distribució de l'expressió dins la neurona dels DRG. La barra d'escala indica 100 µm. B) Percentatge del número de neurones grans respecte el total en el DRG que expressen frataxina recombinant respecte el total. Es van avaluar 2 ratolins de cada grup (1 femella i 1 mascle). Les barres d'error representen el SEM.

Quantitativament, es va calcular el percentatge de neurones grans dels DRG que expressaven frataxina recombinant respecte el total que contenien, per conèixer la distribució exacta a nivell cel·lular dels rAAV9 dins dels DRG. Els DRG lumbar, els quals es trobaven més pròxims al punt d'administració, van mostrar el percentatge de neurones transduïdes més elevat, amb un 59,7%. Per sota, tant els DRG toràcics com cervicals van mostrar un percentatge de neurones transduïdes inferior, amb un 12,9% i 17,8% respectivament, indicant que gran part de les

partícules virals transdueixen en el lloc d'administració, i que la distribució pel líquid cefalorraquidi, tot i ser destacable i substancial, disminueix.

2.3. Avaluació de la durada de l'expressió de proteïna frataxina recombinant.

Un dels motius pels quals es va incloure el promotor humà del PGK en el vector rAAV9-FXN va ser per intentar proveir una expressió de llarga durada de la proteïna frataxina recombinant en els ratolins amb tan sols una única administració del vector viral.

Per tal de detectar expressió a llarg termini es va extreure proteïna total de fetge, medul·la espinal lumbar i DRG lumbar de ratolins Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de 24 mesos d'edat i es va analitzar per western-blot per comparar-la amb l'expressió obtinguda en aquests teixits de ratolins Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 3, 7 i 14 mesos d'edat.

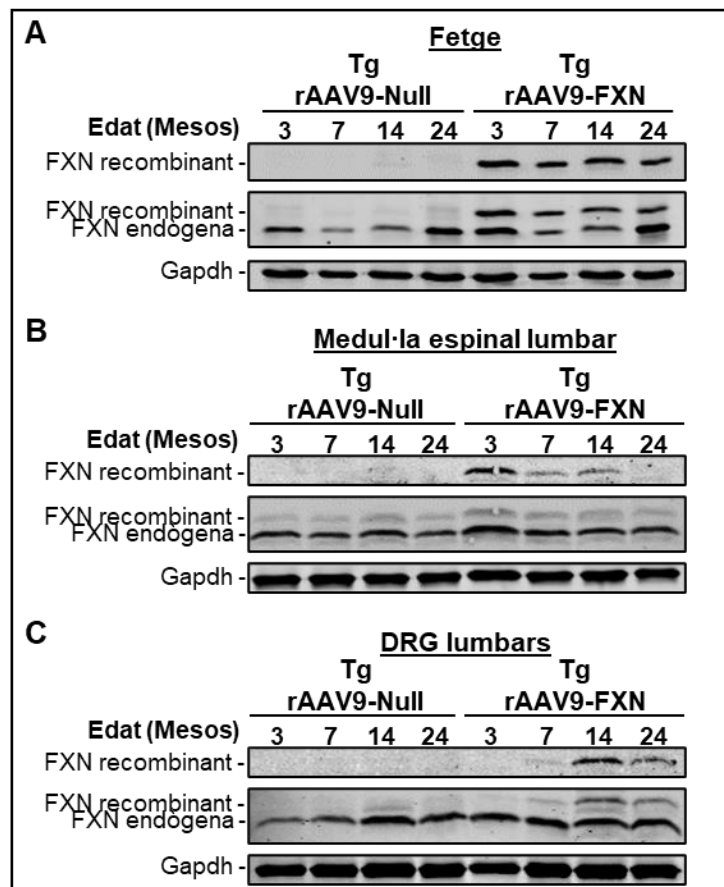


Figura 41. Avaluació de la duració de l'expressió de proteïna frataxina recombinant en teixits sistèmics i nerviosos de ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN. Imatges obtingudes per western-blot a partir d'extractes totals de proteïna de **A)** fetge, **B)** medul·la espinal lumbar i **C)** DRG lumbar, de ratolins Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 3, 7, 14 i 24 mesos d'edat. Es va detectar la proteïna frataxina humana recombinant i del transgèn de ratolí amb els anticossos contra HA i FXN. Es va utilitzar l'expressió de Gapdh com a control de càrrega.

Es va detectar expressió de frataxina recombinant fins almenys els 2 anys de vida del ratolí, és a dir 22 mesos després de l'administració del vector rAAV9-FXN mitjançant western-blot en tots els teixits analitzats, tant sistèmics com és el cas del fetge, com del sistema nerviós central com la medul·la espinal lumbar i del sistema nerviós perifèric com es va veure en els DRG lumbar (Figura 41). En canvi, els ratolins administrats amb el vector rAAV9-Null no van mostrar expressió de frataxina recombinant. Malgrat tenir únicament una mostra per cada edat, els resultats van indicar que en el fetge, l'expressió de frataxina recombinant era robusta al llarg del temps des dels 3 fins als 24 mesos d'edat del ratolí (Figura 41A). En la medul·la espinal lumbar, als 3 mesos d'edat es va veure l'expressió de frataxina recombinant més elevada. Aquesta es va veure una mica disminuïda en els 7 mesos, però es va mantenir de manera substancial fins almenys els 14 mesos d'edat. Posteriorment, en els 24 mesos d'edat l'expressió de frataxina es veure disminuïda dràsticament (Figura 41B). En canvi, curiosament en els DRG lumbar es va observar la tendència contrària. Als 3 mesos d'edat no es va observar expressió de frataxina recombinant, mentre que progressivament va incrementar fins als 14 mesos d'edat i pràcticament es va mantenir fins als 24 mesos d'edat dels ratolins (Figura 41C).

Aquests resultats van ser únicament indicatius però no conclusius degut a que únicament es va analitzar un ratolí a cada edat. Per poder avaluar estadísticament i de manera conclusiva els nivells d'expressió de proteïna frataxina recombinant caldria realitzar un estudi amb més animals. En qualsevol cas, va servir per demostrar expressió de frataxina recombinant provinent del vector rAAV9-FXN en els ratolins YG8R amb una administració intratecal tant en teixits sistèmics com teixits del SNC i SNP de manera robusta al llarg del temps.

2.4. Quantificació dels nivells d'expressió de la proteïna frataxina recombinant.

Diversos estudis havien descrit que els pacients amb atàxia de Friedreich tenien una expressió variable de proteïna frataxina, depenent del teixit, però que es trobava aproximadament en un rang entre 5-40% d'expressió respecte els individus sans no portadors, mentre que els individus sans portadors tenien aproximadament entre 30-75% (15,100,101). Prèviament en aquest estudi, s'havia determinat que en cèl·lules fibroblasts, els pacients amb FRDA contenien aproximadament un 17% de frataxina respecte els individus sans no portadors, mentre que els individus sans portadors expressaven un 28% de frataxina (veure apartat 2.2 del capítol I de resultats). Donat que els individus portadors són asimptomàtics, tot i tenir menys nivells d'expressió de frataxina que els individus no portadors, es va establir que era necessari incrementar com a mínim aproximadament un 11% els nivells que expressen les cèl·lules dels individus afectes, per aconseguir expressar uns nivells de frataxina no patològics, i per tant en un rang potencialment terapèutic.

Per conèixer els nivells d'expressió de frataxina recombinant que era capaç de proporcionar el vector rAAV9-FXN administrat intratecalment en els teixits dels ratolins, es va avaluar mitjançant western-blot l'extracte total de proteïna de DRG lumbar i medul·la espinal lumbar de 8 ratolins (4 femelles i 4 mascles) de cadascun dels grups WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat, és a dir, 12 després de l'administració intratecal dels rAAV9. Es van avaluar aquests teixits perquè són els primers que degeneren en l'atàxia de Friedreich, amb més afectació i que causen els símptomes neurològics principals com la neuropatia sensitiva i l'atàxia i la propiocepció, afectant a l'autonomia dels pacients.

Per identificar específicament les formes madures de la frataxina humana recombinant provinent del vector rAAV9-FXN, la frataxina humana transgènica dels ratolins YG8R, i la frataxina endògena murina dels ratolins WT + rAAV9-Null, es van utilitzar anticossos contra HA i la proteïna FXN.

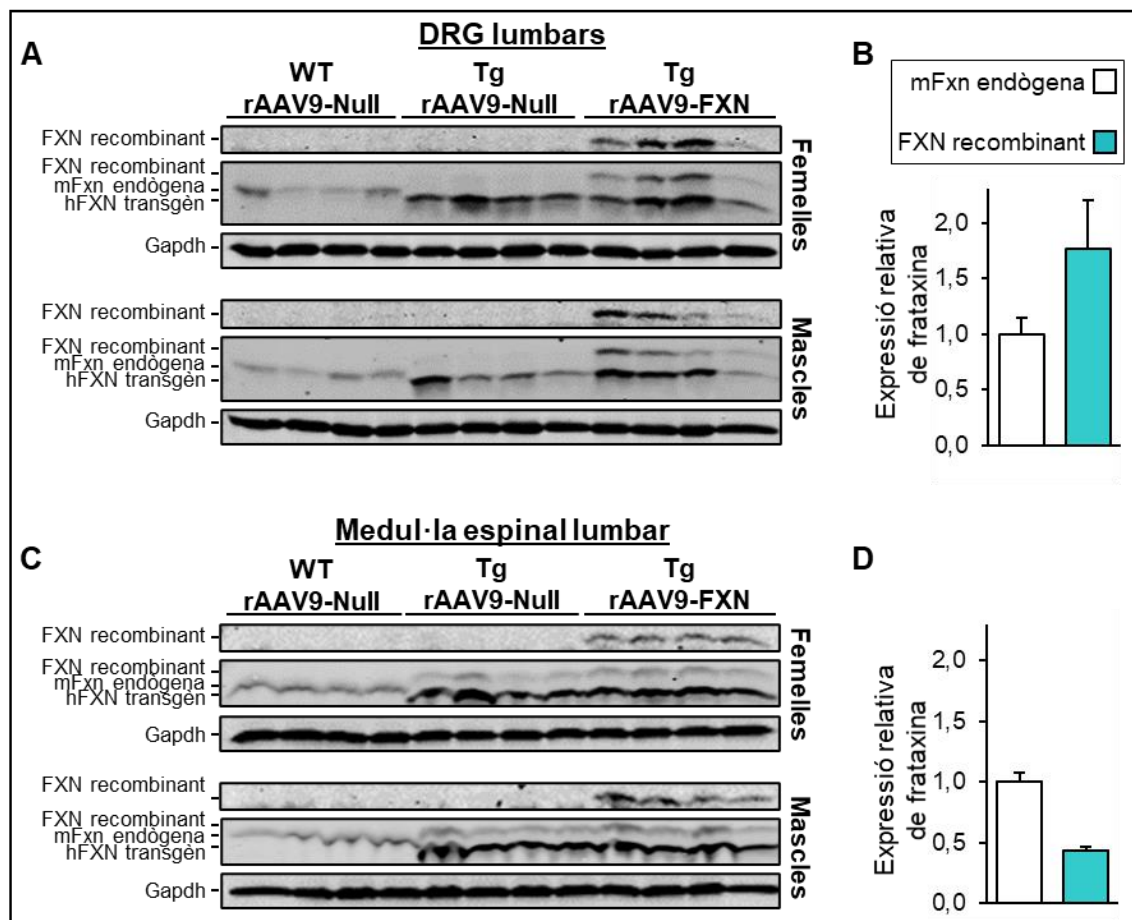


Figura 42. Quantificació dels nivells de frataxina en els DRG i medul·la espinal lumbar de ratolins administrats amb vectors virals adenoassociats als 14 mesos d'edat. A i C) Western-blot de DRG lumbar i medul·la espinal lumbar respectivament, utilitzant anticossos primaris anti-HA (bloc superior) i anti-FXN (bloc del mig), tant en femelles com en mascles, per detectar la proteïna FXN recombinant del vector rAAV9-FXN, la frataxina endògena de ratolí (mFxn endògena), i la frataxina humana del transgèn

dels ratolins YG8R (hFXN transgèn). Es van analitzar 8 ratolins en total (4 femelles i 4 mascles) dels grups WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN. L'expressió del Gapdh es va utilitzar com a control intern de càrrega. **B i D)** Quantificació dels nivells d'expressió relatius de frataxina recombinant dels ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN comparats amb els nivells de frataxina endògena murina que expressen els ratolins control WT + rAAV9-Null en els DRG lumbar i medul·la espinal lumbar, respectivament. Els valors d'expressió de mFxn endògena es van normalitzar a 1.

Es va detectar expressió de frataxina recombinant en els DRG i medul·la espinal lumbar de tots els ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN. En canvi, aquesta no es va detectar en cap dels ratolins WT + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-Null en ambdós teixits analitzats (**Figura 42A i C**). Qualitativament es va veure que els nivells d'expressió de frataxina endògena murina que presentaven els ratolins WT + rAAV9-Null eren inferiors als nivells d'expressió de frataxina humana del transgèn dels ratolins Tg + rAAV9-Null tant en els DRG com en la medul·la espinal lumbar, confirmant el que s'havia descrit en el model YG8R, en que determinats teixits tenen nivells elevats de frataxina humana, però tot i així insuficients per evitar manifestar la malaltia (289).

Amb l'anticòs anti-FXN, capaç d'identificar totes les formes de frataxina, es va detectar una banda amb la mateixa mida que la frataxina recombinant (17 kDa) en tots els ratolins Tg + rAAV9-Null en la medul·la espinal lumbar, igual a com s'havia vist anteriorment (apartat 2.2 del capítol I de resultats). Aquesta banda, corresponia a la forma intermediària de frataxina humana del transgèn que expressaven els ratolins YG8R. En els DRG, aquesta banda no es va detectar.

Els nivells d'expressió de frataxina recombinant en DRG i medul·la espinal lumbar dels ratolins Tg + rAAV9-FXN es van quantificar i comparar amb els nivells d'expressió de frataxina endògena murina dels ratolins control WT + rAAV9-Null, tal com es va fer en humans, en que es van comparar els nivells dels pacients amb FRDA amb els dels individus sans no portadors (apartat 2.2 del capítol I de resultats). Els ratolins control WT + rAAV9-Null, eren sans i per tant, expressaven els nivells màxims no patològics de frataxina endògena. Agafant aquests valors com a referència i normalitzant-los a 1, els nivells d'expressió de frataxina recombinant que es van aconseguir en els DRG lumbar de ratolins administrats amb rAAV9-FXN van ser de 1,76, per sobre dels nivells d'expressió endògena dels ratolins WT + rAAV9-Null. En canvi, en la medul·la espinal lumbar, aquesta expressió relativa va ser de 0,43, més baixa que en els DRG, però igualment substancial. Extrapolant aquests valors d'expressió, en humans estarien per sobre dels nivells mínims que és necessari aportar en les cèl·lules dels individus afectes, per arribar als nivells d'expressió dels individus portadors o inclús no portadors, en aquests teixits mitjançant l'administració intratecal de rAAV9-FXN.

Capítol IV. Avaluació de l'eficàcia terapèutica del tractament de teràpia gènica en els ratolins YG8R.

1. Avaluació del fenotip motor i sensitiu dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

Als pacients amb atàxia de Friedreich se'ls avalua el grau d'afectació de la malaltia i la seva evolució mitjançant escales numèriques establertes i consensuades en la comunitat científica, com són l'escala SARA, FARS o ICARS realitzant diferents tests, on s'analitzen les característiques fenotípiques de la malaltia com la coordinació motora, la marxa, la propiocepció, els potencials d'acció dels nervis perifèrics, el reflex Babinski, l'absència de reflexos tendinosos, etc. De la mateixa manera, per avaluar el grau d'afectació fenotípic característic de la malaltia en els ratolins transgènics hemizigots YG8R amb atàxia de Friedreich, es van avaluar diferents tests de comportament similars a algunes de les proves que s'utilitzen per monitoritzar la malaltia en humans. Per això es va realitzar el test del rotarod accelerat, es va avaluar la polineuropatia sensitiva del nervi caudal de la cua, el manteniment del reflex d'agafada, i l'anàlisi de la marxa. Algunes d'aquestes ja s'havien avaluat anteriorment pel grup del Dr. Mark Pook, qui va generar el model de ratolí YG8R, demostrant l'afectació fenotípica d'aquests ratolins (192,287). D'altres en canvi, no s'havien estudiat profundament, o directament no s'havien avaluat.

El model de ratolí YG8R hemizigot, tot i expressar nivells elevats de frataxina humana en alguns teixits nerviosos, aquests nivells no han demostrat ser suficients com per evitar l'aparició de la patologia fenotípica característica de l'atàxia de Friedreich (192,287). El model YG8R ratolins requereix més frataxina per tal revertir aquesta afectació, ja que s'ha descrit que ratolins YG8R homozigots pel transgèn, amb més quantitat de frataxina humana, presenten un fenotip menys patològic, similar al dels ratolins control WT (289). D'acord amb això, el tractament de teràpia gènica que havia demostrat capacitat per incrementar els nivells de frataxina en diversos teixits podia prevenir l'afectació fenotípica característica de la malaltia en aquest model de ratolí.

Per tal d'avaluar l'eficiència del tractament de teràpia gènica els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN) es va avaluar el fenotip motor i sensitiu d'aquests ratolins mitjançant tests de comportament al llarg del temps i es van comparar amb ratolins YG8R administrats de la mateixa forma amb el vector buit rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null), ja que així tots els ratolins van sofrir el mateix procediment d'injecció intratecal entre les vertebres L3-L4 de la columna vertebral, i van rebre un número similar de partícules virals del mateix serotip AAV9. Per tant, qualsevol millora o efecte va ser deguda exclusivament al tractament amb rAAV9-FXN, donat que per la resta s'havien tractat exactament igual i eren genèticament idèntics, amb capacitat de desenvolupar la simptomatologia característica de l'atàxia de Friedreich. També es van incloure ratolins WT, que es van administrar intratecalment amb el vector buit rAAV9-Null (WT + rAAV9-Null) per la mateixa raó, i que es van utilitzar com a control sa de referència, sense afectació fenotípica. Així doncs, la comparació dels tres grups de

ratolins va permetre per una banda determinar l'afectació fenotípica dels ratolins YG8R hemizigots administrats amb el vector rAAV9-Null, i per l'altra avaluar l'efecte de l'administració intratecal de rAAV9-FXN en els ratolins YG8R.

Aquesta avaluació es va realitzar fins als 14 mesos d'edat en els ratolins perquè per una banda l'atàxia de Friedreich és una malaltia neurodegenerativa amb una patologia progressivament més severa en el temps, i d'altra banda perquè el vector rAAV9-FXN havia demostrat ser capaç de proveir una expressió robusta i prolongada de frataxina recombinant, i per tant amb capacitat terapèutica fins almenys aquesta d'edat.

Per les diferents proves de comportament, es van utilitzar un mínim de 10 ratolins per cada grup, amb el mateix número de mascles que de femelles, en aquest cas 5 de cada gènere, per tal de tenir en compte ambdós sexes, ja que l'atàxia de Friedreich afecta per igual als dos en humans. Donades les diferències que existeixen entre ells en ratolins pel que fa a mida i pes principalment, es va seleccionar tenir el mateix número entre grups per poder fer una bona comparació.

1.1. Avaluació de la polineuropatia sensitiva perifèrica mitjançant electrofisiologia del nervi caudal.

Una de les característiques fisiopatològiques principals i que primer apareixen en els pacients amb atàxia de Friedreich és la polineuropatia sensitiva. Aquesta es caracteritza per la degeneració sensitiva dels nervis perifèrics a través de la pèrdua d'axons i fibres grans mielinitzades. Per tal d'avaluar-la es realitzen mesures electrofisiològiques en els nervis perifèrics de les extremitats dels pacients que esdevenen en una reducció severa o pèrdua completa dels potencials d'acció sensitius i una lleugera disminució de les velocitats de conducció nerviosa.

En el model de ratolí YG8R aquest aspecte no s'havia estudiat en profunditat. Inicialment, tan sols s'havia vist una tendència alterada del potencial d'acció i no tant de la velocitat de conducció nerviosa als 20 mesos d'edat, ambdós no significatives, però en només dos animals per grup comparat amb ratolins WT (192). Més recentment, un estudi no va determinar diferències en les velocitats de conducció nervioses en el nervi caudal de la cua en aquest model de ratolí als 9 mesos d'edat, però sí una alteració de la duració del potencial d'acció sensitiu (288).

Quan s'estimula elèctricament un nervi perifèric, primer es desencadena un potencial d'acció sensitiu, i posteriorment apareix un potencial d'acció motor en resposta a l'estímul. Inicialment, es va posar apunt la tècnica en un ratolí control per identificar el potencial d'acció sensitiu del nervi caudal de la cua i diferenciar-lo del potencial d'acció motor mitjançant la mesura electrofisiològica abans i després de l'administració intraperitoneal de succinil colina en el ratolí. La succinil colina és un relaxant muscular que inhibeix el potencial d'acció motor del nervi.

D'aquesta manera, el potencial d'acció motor va desaparèixer, confirmant que el primer potencial d'acció que apareixia en l'espectre resultant de la mesura electrofisiològica corresponia al potencial d'acció sensitiu (**Figura 43C**).

Un cop es va confirmar la identificació del potencial d'acció sensitiu, per tal d'avaluar la polineuropatia sensitiva en els ratolins, es va mesurar l'amplitud d'aquest potencial en el nervi caudal de la cua dels ratolins per electrofisiologia, estimulant el nervi mitjançant un impuls elèctric. Es va monitoritzar la polineuropatia dels mateixos ratolins al llarg del temps des dels 4 fins als 13 mesos d'edat. L'amplitud (μV), que defineix la intensitat d'estimulació del nervi, es va mesurar des de l'aparició del potencial d'acció fins al pic màxim d'intensitat del potencial.

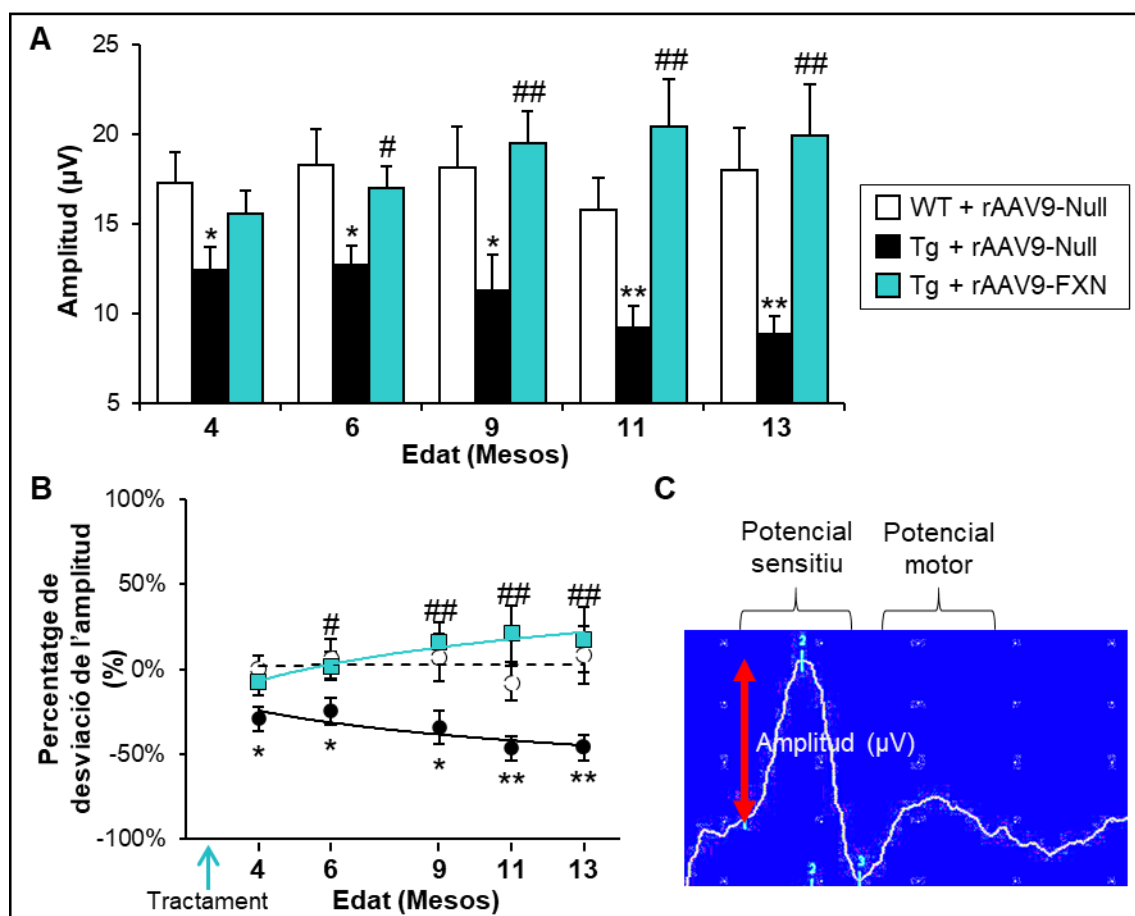


Figura 43. Avaluació neuroelectrofisiològica de la polineuropatia sensitiva del nervi caudal dels ratolins. **A)** Mesura electrofisiològica dels valors de mitjana d'amplitud del potencial d'acció sensitiu del nervi caudal de la cua dels ratolins al llarg del temps des dels 4 fins als 13 mesos d'edat. **B)** Percentatge de desviació dels valors d'amplitud de cada grup de ratolins en el temps. Es va definir la mitjana dels valors d'amplitud inicials dels ratolins WT + rAAV9-Null als 4 mesos d'edat com valor de referència. **C)** Representació de la mesura electrofisiològica del nervi caudal de la cua dels ratolins. Primer apareix el potencial sensitiu i a continuació el potencial motor. Les fletxa en vermell defineix la mesura de l'amplitud del potencial que es va adquirir. Es van avaluar un total de 10 ratolins per grup (5 femelles i 5 mascles) de WT + rAAV9-Null (blanc), Tg + rAAV9-Null (negre) i Tg + rAAV9-FXN (blau). Les línies representen la

tendència dels valors d'amplitud en el temps. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null; ## $P < 0,01$, Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null.

L'avaluació neuroelectrofisiològica del nervi caudal sensitiu de la cua dels ratolins transgènics hemizigots YG8R control, administrats amb el vector rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) va mostrar una reducció progressiva dels valors d'amplitud al llarg del temps, significativa des dels 4 mesos fins almenys els 14 mesos d'edat quan es va comparar amb els ratolins control WT administrats amb el vector rAAV9-Null (WT + rAAV9-Null). Els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN) van mostrar el manteniment dels valors d'amplitud en el temps, en un nivell similar als ratolins control WT + rAAV9-Null fins almenys els 13 mesos d'edat. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van demostrar tenir valors significativament més elevats d'amplitud respecte els ratolins Tg + rAAV9-Null als 6, 9, 11 i 13 mesos d'edat (**Figura 43A**) (**Taula 17**).

Per tal de saber el percentatge de desviació dels valors d'amplitud de cada grup de ratolins en funció del temps, es va comparar els valors d'amplitud de cadascun dels ratolins individualment de tots els grups en cada edat de mesura, respecte la mitjana dels inicials als 4 mesos d'edat del grup de ratolins control WT + rAAV9-Null (**Figura 43C**). D'aquesta manera, es va veure que als 4 mesos d'edat, els ratolins Tg + rAAV9-Null ja presentaven polineuropatia sensitiva en el nervi caudal de la cua, amb una reducció negativa dels valors d'amplitud del -29% respecte els ratolins WT + rAAV9-Null en la mateixa edat. Aquesta desviació negativa va anar augmentant progressivament al llarg del temps fins al -46% als 13 mesos d'edat. En canvi, els ratolins WT + rAAV9-Null van mostrar uns valors pròxims al zero, entre -8% i 8% de desviació en l'amplitud respecte els valors inicials als 4 mesos d'edat. Aquesta desviació no va ser significativa i es va atribuir a la variabilitat de lectura que dona l'instrument de mesura electrofisiològica. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN ja inicialment en la primera lectura als 4 mesos d'edat van demostrar tenir valors iguals als dels ratolins WT + rAAV9-Null. Van mostrar una tendència creixent en els valors d'amplitud progressivament al llarg del temps fins al 21% als 11 mesos d'edat, sense arribar a ser estadísticament significativa respecte els ratolins WT + rAAV9-Null en cap de les mesures. Per tant, l'efecte del tractament amb rAAV9-FXN prevé l'afectació neuroelectrofisiològica al llarg del temps en el nervi caudal de la cua dels ratolins YG8R.

Edat (Mesos)	WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null	Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null
4	[$F_{(1,17)} = 4,986, P = 0,039$]	[$F_{(1,16)} = 2,949, P = 0,105$]
6	[$F_{(1,15)} = 5,917, P = 0,028$]	[$F_{(1,15)} = 6,986, P = 0,018$]
9	[$F_{(1,15)} = 4,543, P = 0,049$]	[$F_{(1,15)} = 9,132, P = 0,009$]
11	[$F_{(1,15)} = 9,263, P = 0,008$]	[$F_{(1,16)} = 12,979, P = 0,002$]
13	[$F_{(1,17)} = 11,304, P = 0,004$]	[$F_{(1,17)} = 12,491, P = 0,003$]

Taula 17. Resultats estadístics de l'avaluació electrofisiològica del nervi caudal de la cua dels ratolins al llarg del temps.

1.2. Avaluació de la coordinació motora i l'atàxia amb rotarod accelerat.

En l'atàxia de Friedreich, el principal signe fenotípic que manifesten els pacients és la descoordinació motora o atàxia. Aquesta s'avalua en les tres escales ICARS, FARS i SARA mitjançant l'anàlisi de la funció cinètica de les extremitats, de la marxa i de la postura, entre altres. En els ratolins la forma més comú d'avaluar la coordinació motora és amb el test del rotarod accelerat. Per realitzar aquest anàlisi, els ratolins es van col·locar en una barra cilíndrica suspesa a 30 cm d'alçada, que girava acceleradament de 0 a 40 rpm durant 5 min. Els ratolins caminen i corren per la roda, per evitar caure, fins que no aguanten més i cauen, enregistrant el temps de latència en la roda. D'aquesta manera, ratolins amb problemes de coordinació motora com ha demostrat el model YG8R en estudis anteriors, aguanten menys temps en roda (192,287,289). Per avaluar comparativament la coordinació motora, es va calcular la mitjana dels valors de latència en la roda dels 4 trials realitzats de cada ratolí, i a continuació, es va quantificar i representar la mitjana de la latència en roda dels grups de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN per cada mes analitzat (**Figura 44**).

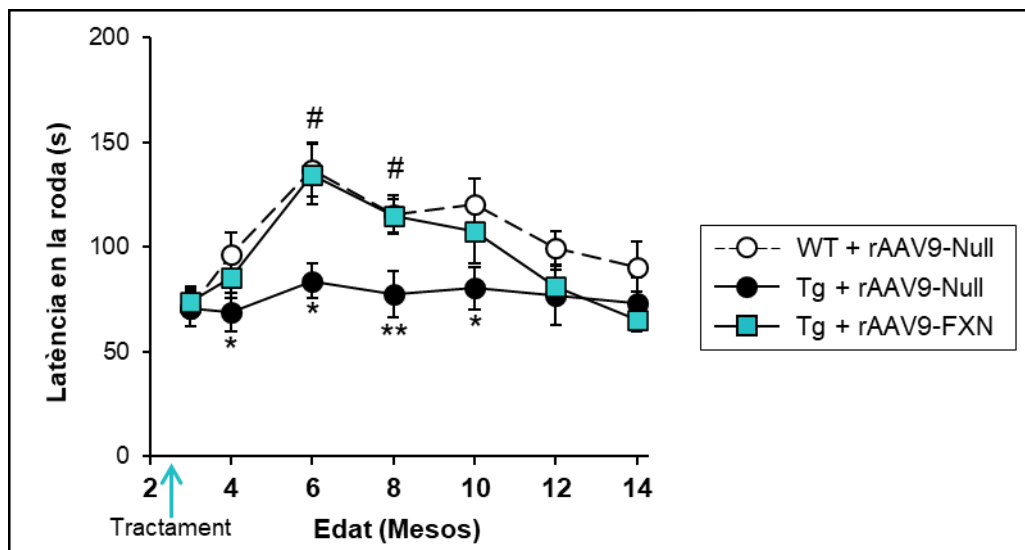


Figura 44. Avaluació de la coordinació motora i l'atàxia amb el test del rotarod. Quantificació de la latència mitjana en la roda de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN mesurada al llarg del temps, des dels 3 fins als 14 mesos d'edat. Es van avaluar un total de 10 ratolins per grup (5 femelles i 5 mascles). Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

Els resultats obtinguts en el test del rotarod accelerat van mostrar que als 3 mesos d'edat tots els grups de ratolins tenien els mateixos valors de latència en roda, indicant que els ratolins Tg + rAAV9-Null no presentaven afectació motora a aquesta edat. En els següents mesos, el grup de ratolins control WT + rAAV9-Null va demostrar un increment progressiu de la latència en la roda des dels 3 fins als 6 mesos d'edat passant dels 70 als 137 s de mitjana. En canvi, els ratolins Tg + rAAV9-Null no van mostrar cap increment del temps de latència en roda al llarg del temps respecte als valors obtinguts als 3 mesos d'edat, mantenint-se pràcticament invariables, entre 69 i 84 s, fins als 14 mesos d'edat. Això va indicar que els ratolins Tg + rAAV9-Null presentaven problemes d'aprenentatge motor, que van ser estadísticament significatius des dels 4 fins als 10 mesos d'edat. Els ratolins WT + rAAV9-Null després dels 6 mesos d'edat, van mostrar una reducció progressiva de la latència en roda fins als 14 mesos d'edat, degut a l'envelliment. Tot i això, les diferències amb els ratolins Tg + rAAV9-Null van seguir sent destacables i estadísticament significatives als 8 i 10 mesos d'edat amb valors de 116 i 120 s respectivament. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van presentar un patró similar al ratolí control WT + rAAV9-Null al llarg del temps. Des dels 3 fins als 6 mesos d'edat van mostrar un increment de la latència en roda, de 74 a 135 s, sent estadísticament significatius als 6 i 8 mesos d'edat respecte els ratolins Tg + rAAV9-Null, i posteriorment aquesta latència va descendir progressivament degut a l'envelliment, de la mateixa manera que els ratolins control WT + rAAV9-Null, però de manera més accentuada, tot i que no significativa, degut a que el model de ratolí YG8R presenta un major augment de pes respecte el WT. Per tant, el tractament rAAV9-FXN va demostrar prevenir l'afectació de la coordinació i aprenentatge motors dels ratolins YG8R amb atàxia de Friedreich (**Figura 44**) (**Taula 18**).

Edat (Mesos)	WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null	Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null
3	[$F_{(2,27)} = 0,061, P = 0,975$]	[$F_{(2,27)} = 0,061, P = 0,765$]
4	[$F_{(2,27)} = 2,040, P = 0,042$]	[$F_{(2,27)} = 2,040, P = 0,339$]
6	[$F_{(2,27)} = 6,089, P = 0,011$]	[$F_{(2,27)} = 6,089, P = 0,013$]
8	[$F_{(2,27)} = 5,245, P = 0,008$]	[$F_{(2,27)} = 5,245, P = 0,031$]
10	[$F_{(2,27)} = 2,456, P = 0,016$]	[$F_{(2,27)} = 2,456, P = 0,544$]
12	[$F_{(2,27)} = 1,331, P = 0,262$]	[$F_{(2,27)} = 1,331, P = 0,995$]
14	[$F_{(2,27)} = 1,600, P = 0,536$]	[$F_{(2,27)} = 1,600, P = 0,787$]

Taula 18. Resultats estadístics de l'avaluació del primer dia del rotarod accelerat dels ratolins al llarg del temps.

1.3. Avaluació del reflex d'agafada.

Els pacients amb atàxia de Friedreich presenten un reflex de Babinski positiu, degut al síndrome piramidal, caracteritzat per l'afectació dels axons motors que viatgen des de l'escorça cerebral fins el tracte corticoespinal de la medul·la espinal. El reflex de Babinski s'avalua fregant la planta del peu i s'obté una resposta que en adults és normal quan hi ha un plegament dels dits cap a la planta del peu. En canvi, els pacients amb FRDA estiren el dit gros del peu cap amunt i obren la resta en forma de ventall, indicant l'afectació de la via piramidal. D'una manera semblant, els ratolins sans WT quan són agafats i sospesos per la cua cap per avall, mostren l'anomenat reflex d'agafada o *clasp*ing, en el qual estiren les potes posteriors per intentar agafar-se a un objecte. Aquest reflex s'ha vist alterat en alguns models de ratolí de diverses malalties neurològiques, amb degeneració principalment en el còrtex sensorimotor, cerebel, medul·la espinal, DRG, estriat i neocòrtex, de manera que s'utilitza com a marcador de neurodegeneració del tracte corticoespinal del sistema nerviós (580). Els ratolins que pateixen neurodegeneració perden el reflex d'agafada i són incapaços d'estirar les potes posteriors, replegant-les cap a l'abdomen.

Per tal de quantificar el grau d'afectació d'aquest reflex, es va definir una escala de 0 a 3 en funció de la capacitat dels ratolins per estirar les potes posteriors, on una puntuació de 0 va indicar un reflex d'agafada normal i per tant no patològic, i el valor 3 va indicar un fenotip patològic més sever del tracte motor corticoespinal del sistema nerviós (**Figura 45A**).

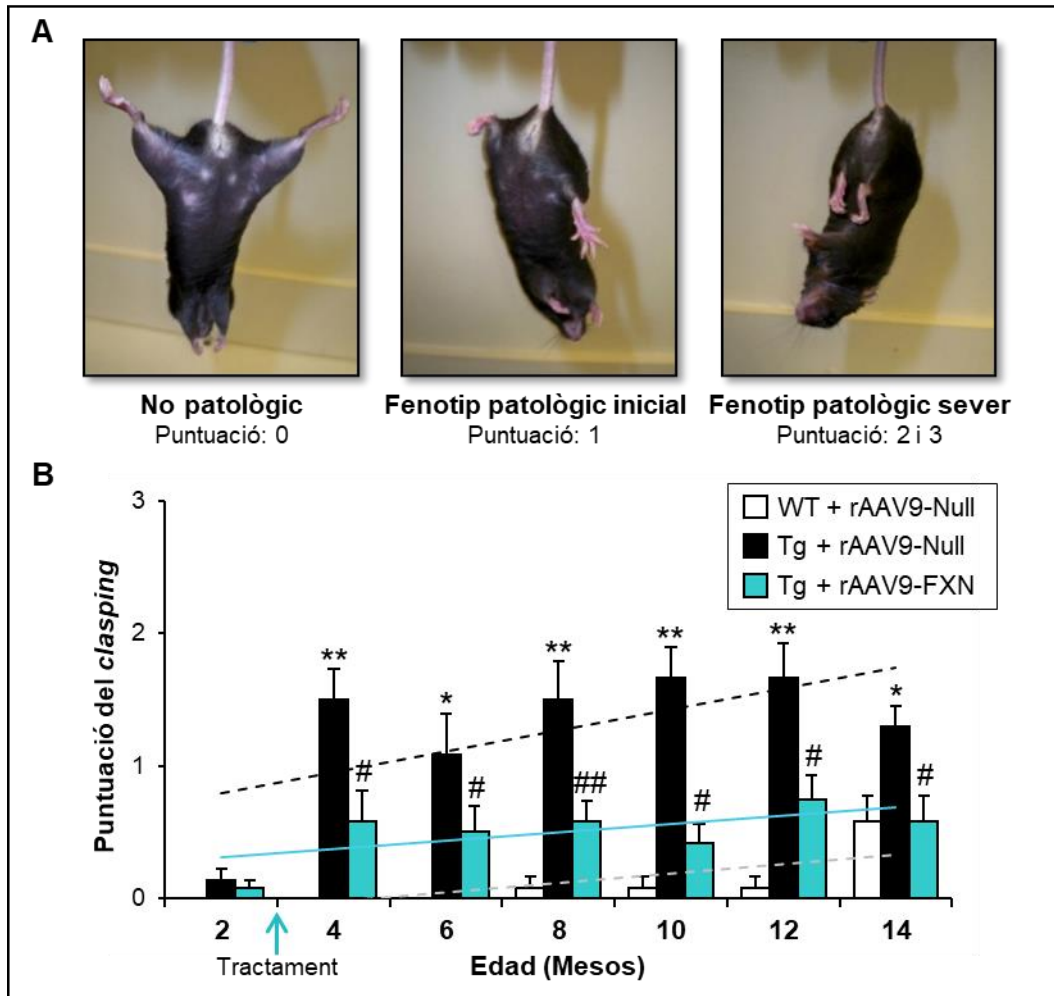


Figura 45. Avaluació del reflex d'agafada en els ratolins YG8R administrats amb rAAV9-FXN. **A)** Puntuació assignada del 0 al 3 per al reflex d'agafada. Puntuació 0: els ratolins mostren un reflex normal d'agafada amb les dues potes posteriors completament estirades, indicant un fenotip no patològic. Puntuació 1: el ratolí presenta una pota parcialment retreta cap a l'abdomen, indicant l'inici del fenotip patològic. Puntuació 2 i 3: Les dos potes estan parcialment o completament retretes, respectivament, indicant una patologia severa. **B)** Mesura del reflex d'agafada en el temps. Es representa la mitjana de la puntuació del reflex d'agafada dels grups WT + rAAV9-Null (blanc), Tg + rAAV9-Null (negre) i Tg + rAAV9-FXN (blau) des dels 2 fins als 14 mesos d'edat. Es van avaluar un total de 12 ratolins per grup (6 femelles i 6 mascles). La fletxa blava indica l'edat d'administració dels rAAV9. Les línies indiquen la tendència lineal de la puntuació del reflex d'agafada de cada grup en el temps. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null; ### $P < 0,01$, Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null.

Inicialment als 2 mesos d'edat, previ a l'administració dels vectors rAAV9 tots els ratolins dels diferents grups van demostrar tenir un reflex d'agafada normal, amb una puntuació pròxima a 0. Els ratolins control WT + rAAV9-Null van presentar un reflex d'agafada normal al llarg del

temps, amb valors de pràcticament de 0, excepte als 14 mesos d'edat on van tenir un lleuger increment a uns valors de 0,4, degut principalment a l'edat del ratolí, similar al que va succeir en la prova del rotarod accelerat. El ratolins Tg + rAAV9-Null va ser el grup amb la puntuació més elevada, amb valors entre 1,2 i 1,7 des dels 4 fins als 14 mesos d'edat, sent més elevats significativament que el grup control WT + rAAV9-Null en totes les edats analitzades. Per tant, els ratolins transgènics hemizigots YG8R van mostrar una alteració en el tracte motor corticoespinal del sistema nerviós que apareix aproximadament als 4 mesos d'edat. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van demostrar una puntuació mantinguda entre 0,4 i 0,8 al llarg del temps, més elevada que els ratolins WT + rAAV9-Null, però inferior de manera significativa a la puntuació dels ratolins Tg + rAAV9-Null als 4, 8, 10, 12 i 14 mesos d'edat (**Taula 19**). Per tant, l'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN en els ratolins transgènics hemizigots YG8R a les 10 setmanes va prevenir en gran mesura l'alteració del reflex d'agafada suggerint que s'evita la neurodegeneració del tracte motor superior i inferior del sistema nerviós (**Figura 45B**).

Edat (Mesos)	WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null	Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null
2	[$F_{(2,33)} = 0,588, P = 0,531$]	[$F_{(2,33)} = 0,588, P = 0,832$]
4	[$F_{(2,33)} = 16,269, P = 0,000$]	[$F_{(2,33)} = 16,269, P = 0,026$]
6	[$F_{(2,33)} = 6,498, P = 0,014$]	[$F_{(2,33)} = 6,498, P = 0,278$]
8	[$F_{(2,33)} = 13,781, P = 0,001$]	[$F_{(2,33)} = 13,781, P = 0,031$]
10	[$F_{(2,33)} = 26,278, P = 0,000$]	[$F_{(2,33)} = 26,278, P = 0,000$]
12	[$F_{(2,33)} = 18,090, P = 0,000$]	[$F_{(2,33)} = 18,090, P = 0,022$]
14	[$F_{(2,31)} = 4,709, P = 0,029$]	[$F_{(2,31)} = 4,709, P = 0,029$]

Taula 19. Resultats estadístics de l'avaluació del reflex d'agafada en els ratolins al llarg del temps.

1.4. Avaluació de la marxa mitjançant l'anàlisi de la petjada.

Els pacients amb atàxia de Friedreich presenten com a característica clínica la inestabilitat de la marxa (atàxia) degut a l'afectació propioceptiva causada per la degeneració dels nervis perifèrics sensitius i els DRG. Per tal d'avaluar la marxa en els ratolins es va mesurar la distància dels passos i la posició de les potes a través de l'anàlisi de la petjada (*Footprint analysis*). Les potes dels ratolins es van pintar amb pintura colorant no tòxica, blava per les potes anteriors i vermella per les posteriors, i es van fer passar a través d'un túnel fosc amb paper blanc per enregistrar les petjades. Es va mesurar específicament la mitjana de la llargada de cada passa, l'amplitud base entre les potes, la distància de solapament entre les potes posteriors i anteriors, i la distància diagonal de les potes posteriors (**Figura 46A**).

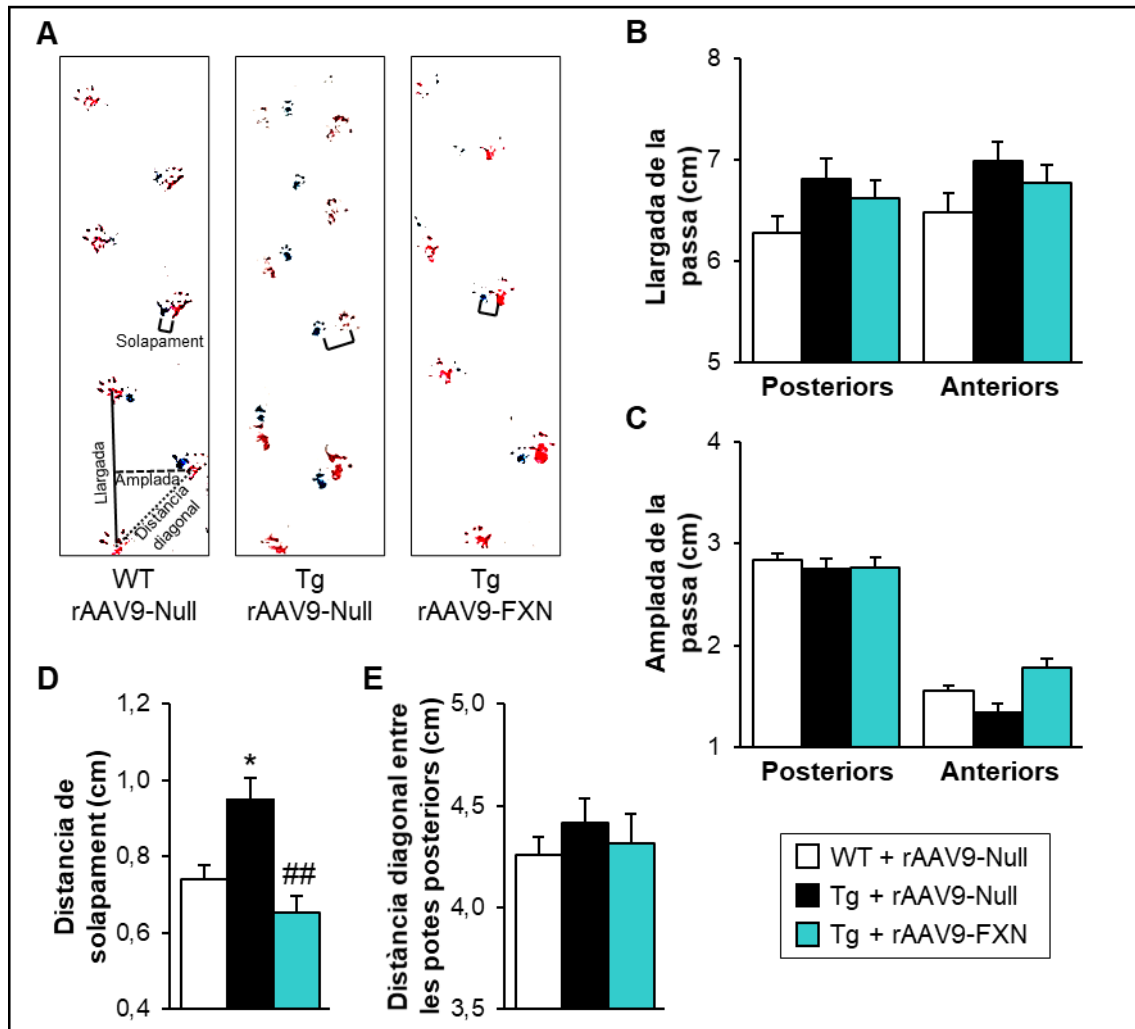


Figura 46. Avaluació de la marxa dels ratolins mitjançant l'anàlisi de la petjada. A) Representació de les petjades registrades d'un ratolí de cada grup WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN. Les potes posteriors estan pintades en vermell i les anteriors en blau. Es mostra la mesura de la llargada de les passes posteriors i anteriors (línia sòlida), l'amplada de les passes posteriors i anteriors (línia amb guions), la distància en diagonal de les potes posteriors (línia puntuada), i el solapament entre les potes posteriors i anteriors (clau). B) Mesura de la mitjana de la llargada de les passes posteriors i anteriors separatament. C) Mesura de la mitjana de l'amplada de les passes posteriors i anteriors separatament. D) Mesura de la distància de solapament entre les potes posteriors i anteriors. E) Mesura de la distància diagonal entre les potes posteriors. Es van analitzar 10 ratolins per grup (5 femelles i 5 mascles) als 12 mesos d'edat. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ## $P < 0,01$, Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null.

Els resultats van demostrar que els ratolins transgènics hemizigots YG8R administrats amb el vector viral rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) als 12 mesos d'edat tenen una alteració de la marxa determinada per un increment de la distància de solapament en cada passa entre les potes anteriors i posteriors tant dreta com esquerra quan es va comparar amb el ratolí control WT administrat amb el vector viral rAAV9-Null (WT + rAAV9-Null) (Figura 46D). Concretament, la distància

de solapament va incrementar significativament, amb uns valors de 0,95 cm en els ratolins Tg + rAAV9-Null, respecte els 0,74 cm de mitjana dels ratolins control WT + rAAV9-Null, indicant una afectació propioceptiva i en conseqüència motora dels ratolins Tg + rAAV9-Null [$F_{(2,27)} = 9,368, P = 0,018$]. Els ratolins transgènics hemizigots YG8R administrats amb el vector viral rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN) van mantenir la distància de solapament similar als valors dels ratolins control WT, inclús lleugerament per sota amb 0,65 cm de mitjana, sent inferiors significativament als valors de solapament dels ratolins Tg + rAAV9-Null [$F_{(2,27)} = 9,368, P = 0,001$] (**Figura 46D**). Per tant, l'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN en els ratolins transgènics hemizigots YG8R va prevenir l'afectació de la marxa caracteritzada per l'alteració del solapament almenys fins als 12 mesos d'edat.

En les altres mesures realitzades els ratolins Tg + rAAV9-Null no van mostrar diferències significatives respecte els ratolins control WT + rAAV9-Null. Tot i que, en la mesura de la llargada de la passa i la distància en diagonal, es va veure un lleuger increment respecte el grup WT + rAAV9-Null (**Figura 46B-E**). De la mateixa manera, es va observar una reducció no significativa de l'amplada de les potes anteriors (**Figura 46C**). Els ratolins YG8R amb el tractament rAAV9-FXN van mostrar una tendència semblant amb els ratolins WT + rAAV9-Null en la mesura de la llargada de la passa en ambdós potes posteriors i anteriors, l'amplada de la passa de les potes anteriors i la distància diagonal entre les potes posteriors, evidenciant en aquest cas, un lleuger efecte del tractament.

1.5. Quantificació de l'índex fenotípic.

En els pacients amb atàxia de Friedreich es quantifica la progressió i severitat de la malaltia mitjançant la mesura d'una sèrie de paràmetres relacionats amb l'estat físic i aspectes motors com l'atàxia de la postura, de la marxa i de les extremitats, entre altres. Aquests paràmetres es troben estandarditzats i definits en escales d'avaluació específiques per la malaltia com són la ICARS, FARS, SARA. A més aquestes escales s'utilitzen per avaluar l'efecte de tractaments en assajos clínics amb pacients.

D'una manera similar, en aquest estudi es va definir un índex fenotípic per avaluar la severitat patològica dels ratolins YG8R i l'eficàcia del tractament amb el vector rAAV9-FXN. Concretament, es va calcular per determinar l'estat del fenotip motor i sensitiu de cadascun dels ratolins analitzats individualment tenint en compte els resultats obtinguts en els 4 tests de comportament de manera conjunta al llarg del temps. Els tests que es van tenir en compte per al càlcul de l'índex fenotípic van ser la neuroelectrofisiologia sensitiva, el rotarod accelerat, el reflex d'agafada i l'anàlisi de la marxa. Per calcular l'índex fenotípic es va normalitzar cadascun dels valors individuals obtinguts de cada ratolí respecte el valor de l'individu més sa, en cada mesura

i per cadascun dels tests avaluats, assignant la puntuació 1 al valor de referència de l'individu més sa. Posteriorment, es va fer la mitjana del valor obtingut en cada individu per cadascun dels 4 tests, atribuint un pes equitatiu d'un 25% per cada test en el càlcul final.

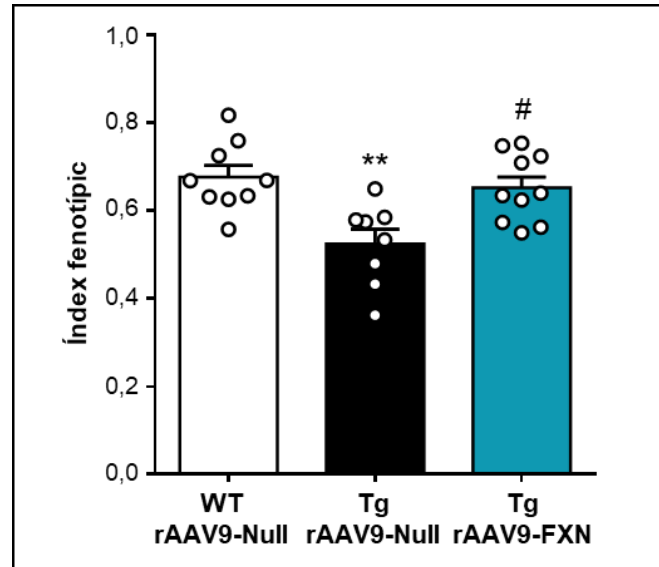


Figura 47. Mesura de l'índex fenotípic al llarg del temps. Càlcul de l'estat fenotípic motor i sensitiv de cadascun dels ratolins WT + rAAV9-Null (blanc) n=9, Tg + rAAV9-Null (negre) n=8 i Tg + rAAV9-FXN (blau) n=10, en base als resultats obtinguts en els tests de neurocomportament del rotarod accelerat, el reflex *clasp*ing, l'anàlisi de la marxa i la neuroelectrofisiologia. L'índex fenotípic es defineix en una escala de valors entre 0 i 1, on 0 representa el fenotip més patològic i 1 el fenotip més sa. Cada cercle indica el valor fenotípic d'un ratolí. Les barres d'error representen el SEM. ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

Es van representar cadascun dels ratolins dels grups WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de manera individual per observar la distribució, i conjuntament per analitzar la mitjana dels valors de cada grup (Figura 47). Els ratolins WT + rAAV9-Null van presentar l'índex més elevat amb 0,68, i per tant, un fenotip sensoriomotor més sa. Els ratolins Tg + rAAV9-Null van mostrar un índex fenotípic molt inferior, de 0,52, tenint una afectació sensoriomotora estadísticament significativa respecte els ratolins control WT + rAAV9-Null [$F_{(2,24)} = 8,091$, $P = 0,003$]. En canvi, els ratolins Tg + rAAV9-FXN van esdevenir en uns valors similars als del ratolí control WT + rAAV9-Null, de 0,65, significativament diferents als ratolins Tg + rAAV9-Null [$F_{(2,24)} = 8,091$, $P = 0,01$], la qual cosa va confirmar que l'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN en els ratolins transgènics hemizigots YG8R prevé l'afectació fenotípica motor i sensitiva pròpia de l'atàxia de Friedreich.

1.6. Monitorització del pes.

En la caracterització dels ratolins YG8R transgènics hemizigots realitzada pel Dr. Mark Pook, es va descriure un increment de pes respecte els ratolins control WT al llarg del temps (192). Per tant, es va monitoritzar el pes dels ratolins cada mes, des dels 2 mesos d'edat, previ a l'administració dels vectors rAAV9, fins als 14 mesos d'edat. Posteriorment es va calcular i representar la mitjana de cada grup de ratolins analitzant els mascles i les femelles per separat degut a les diferències de mida i pes que presenten de per se (**Figura 48**).

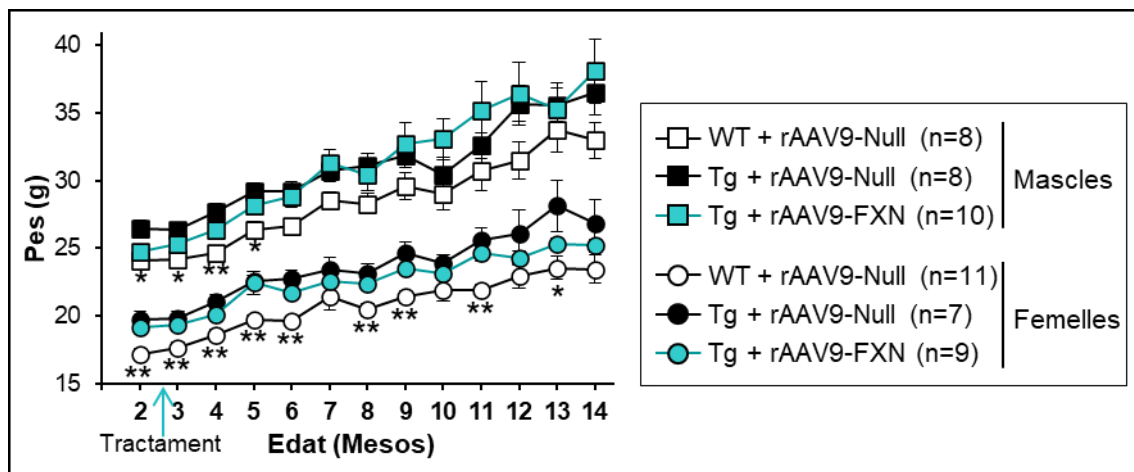


Figura 48. Monitorització del pes. Representació de la mitjana del pes dels ratolins femelles i mascles dels grups WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN des dels 2 fins als 14 mesos d'edat. La fletxa blava indica l'edat de l'administració dels vectors rAAV9. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null; ## $P < 0,01$, Tg + rAAV9-FXN comparat amb Tg + rAAV9-Null.

Els ratolins Tg + rAAV9-Null tant mascles com femelles van mostrar un increment de pes en comparació amb els ratolins control WT + rAAV9-Null. Aquesta diferència de pes va ser estadísticament significativa des de la primera mesura als dos mesos d'edat i es va mantenir almenys fins als 14 mesos. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN en general no van mostrar una reducció en el pes al llarg del temps, tenint valors similars als ratolins Tg + rAAV9-Null i per tant, un pes més elevat que els ratolins control WT + rAAV9-Null. Tot i això, els ratolins mascles Tg + rAAV9-FXN inicialment, des dels 2 fins als 6 mesos d'edat, van presentar uns valors de pes inferiors als ratolins Tg + rAAV9-Null. Les femelles Tg + rAAV9-FXN es van mantenir sempre fins almenys els 14 mesos amb un pes per sota de les femelles Tg + rAAV9-Null. Malgrat aquesta tendència en la prevenció de l'increment de pes en els ratolins transgènics degut al possible efecte de l'administració del vector rAAV9-FXN, la diferència entre aquests dos grups no va ser estadísticament significativa.

2. Avaluació de la neuropatologia i cardiomiopatia dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

Per tal d'avaluar l'efecte del tractament en la neuropatologia i cardiomiopatia dels ratolins transgènics hemizigots YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN es va analitzar la morfologia, estructura i densitat de les cèl·lules i els teixits que es coneix que degeneren en l'atàxia de Friedreich causant els signes principals de la malaltia.

Aquesta avaluació es va realitzar concretament a partir de tincions, amb diferents tècniques histològiques, de seccions dels ganglis de l'arrel dorsal, la medul·la espinal, el cerebel, les arrels dorsals i el cor, extrets de ratolins amb 14 mesos d'edat. Es van comparar les seccions tenyides dels diversos teixits dels ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN (Tg + rAAV9-FXN), amb les dels ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-Null (Tg + rAAV9-Null) i ratolins control WT administrats amb el vector rAAV9-Null (WT + rAAV9-Null). Es va realitzar a aquesta edat perquè per una banda, l'atàxia de Friedreich és una malaltia d'evolució progressiva, i per altra, perquè en estudis previs amb aquest model de ratolí YG8R, tot i que s'havia evidenciat afectació a nivell cel·lular a partir d'entre els 9-12 mesos d'edat, determinades característiques patològiques s'havien vist poc severes o inclús inexistentes (192,287–289). De manera que la determinació patològica a una edat encara més tardana, com són els 14 mesos d'edat, podia permetre identificar una major afectació en els ratolins YG8R, i alhora avaluar millor l'efecte del tractament de teràpia gènica.

2.1. Anàlisi de les neurones dels ganglis de l'arrel dorsal.

Les neurones sensibles dels ganglis de l'arrel dorsal (DRG) són les que primer degeneren en l'atàxia de Friedreich, causant el signe principal de la malaltia que és la polineuropatia sensitiva i l'atàxia. Per aquest motiu, es va analitzar la estructura i morfologia dels DRG lumbar (DRG-L) i toràcics (DRG-T) de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat a partir de seccions tenyides amb hematoxilina-eosina.

Les imatges de les tincions obtingudes per microscòpia van mostrar qualitativament una desorganització en els DRG tant lumbar com toràcics dels ratolins Tg + rAAV9-Null. Les neurones grans sensibles dels DRG van evidenciar una pèrdua de la morfologia i un espai interneuronal buit més gran que en els DRG dels ratolins control WT + rAAV9-Null als 14 mesos d'edat, fet que va suggerir la reducció de la mida de les neurones. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar una millor organització neuronal en el gangli comparat amb el ratolins Tg + rAAV9-Null (**Figura 49A**). Malgrat això, la quantificació de l'àrea de les neurones grans sensibles dels DRG-L i DRG-T no va evidenciar diferències entre els 3 grups de ratolins (**Figura 49B**). De la

mateixa manera, la mesura de la densitat neuronal, definida per la quantitat de neurones per àrea del DRG, es va mantenir invariable en els DRG-L i DRG-T de tots els ratolins (**Figura 49C**).

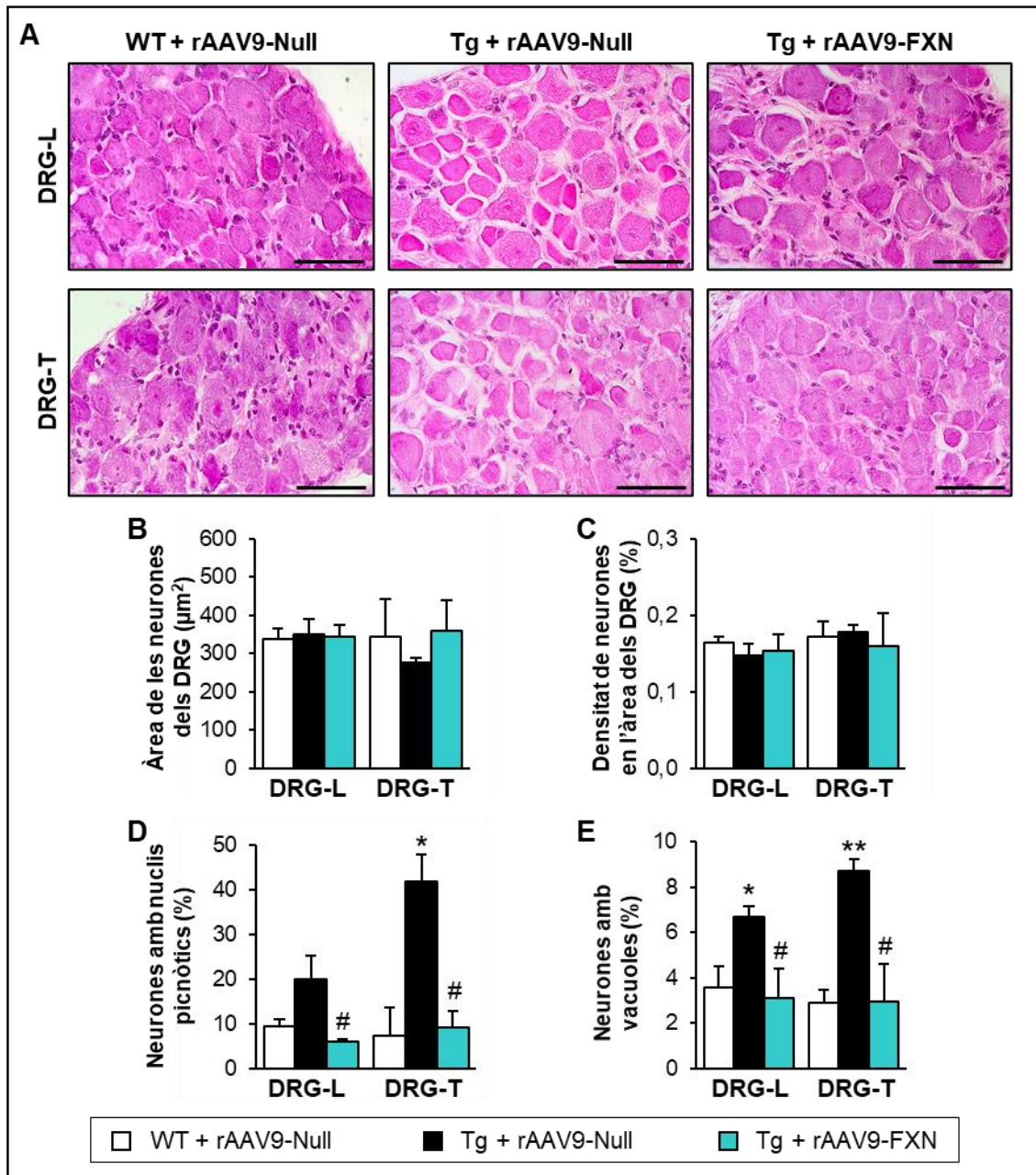


Figura 49. Anàlisi estructural i morfològic dels DRG dels ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN. **A)** Imatges de seccions de DRG lumbar (DRG-L) i toràcic (DRG-T) de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat, tenyides amb hematoxilina-eosina. La barra d'escala indica 50 µm. **B)** Quantificació de l'àrea de neurones grans sensibles dels DRG. **C)** Mesura de la densitat neuronal en el DRG. **D)** Percentatge de neurones amb nuclis picnòtics. **E)** Percentatge de neurones amb vacuolització. Es va analitzar 4 ratolins per grup (2 femelles i 2 mascles). Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

En la quantificació del percentatge de neurones amb nuclis picnòtics, que són neurones amb una condensació irreversible de la cromatina en el nucli, i el percentatge de neurones amb presència de vacuoles, els ratolins Tg + rAAV9-Null van mostrar un increment d'ambdós característiques respecte els ratolins control WT + rAAV9-Null, tant en els DRG-L com DRG-T (**Figura 49D-E**). Concretament, el percentatge de neurones amb nuclis picnòtics dels ratolins Tg + rAAV9-Null en els DRG-L va ser del 20,05%, clarament més elevat, tot i que no significativament, al percentatge de neurones amb nuclis picnòtics dels ratolins WT + rAAV9-Null, que va ser de 9,31% [$F_{(1,5)} = 3,053, P = 0,141$]. En els DRG-T es va observar el mateix increment, aquest cop estadísticament significatiu, amb un percentatge de neurones amb nuclis picnòtics del 41,76% en els ratolins Tg + rAAV9-Null respecte del 7,25% que van mostrar els WT + rAAV9-Null [$F_{(1,3)} = 13,749, P = 0,034$] (**Figura 49D**). Pel que fa al percentatge de neurones amb vacuoles en els DRG-L i DRG-T, els ratolins Tg + rAAV9-Null van mostrar uns percentatges de 6,69% i un 8,71%, respectivament, sent significativament més elevats, en ambdós casos, que els dels ratolins WT + rAAV9-Null, que mostraven un 3,59% i 2,92%, respectivament [$F_{(1,5)} = 10,94, P = 0,021$] [$F_{(2,3)} = 7,389, P = 0,008$] (**Figura 49E**). Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar uns percentatges de neurones amb nuclis picnòtics i vacuoles similars als dels ratolins WT + rAAV9-Null i més baixos significativament que els ratolins Tg + rAAV9-Null, tant en els DRG-L com en DRG-T. En aquests ratolins Tg + rAAV9-FXN, únicament el 5,98% de les neurones dels DRG-L [$F_{(1,6)} = 7,625, P = 0,033$], i el 9,25% dels DRG-T van mostrar nuclis picnòtics [$F_{(2,3)} = 0,126, P = 0,043$]. Mentre que tan sols el 3,09% [$F_{(1,6)} = 6,711, P = 0,041$] i 2,94% [$F_{(2,3)} = 7,389, P = 0,041$] de les neurones grans sensibles van mostrar vacuolització en els DRG-L i DRG-T, respectivament.

Per tant, la neurodegeneració dels DRG en els ratolins YG8R es va caracteritzar per l'increment de neurones amb picnòsis i vacuolització, ambdós indicadors de l'inici de necrosi o apoptosi cel·lular. En canvi, no es va mostrar reducció ni en el número ni en la mida de les neurones grans sensibles dels DRG en els ratolins YG8R respecte els ratolins WT, tot i veure's una desorganització neuronal de manera qualitativa en les imatges de les tincions obtingudes per microscòpia. El tractament amb rAAV9-FXN administrat intratecalment va demostrar ser eficient per prevenir aquesta neurodegeneració cel·lular en els DRG lumbar i toràcics dels ratolins YG8R almenys fins als 14 mesos d'edat.

2.2. Anàlisi de les neurones del nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal.

La neurodegeneració dels DRG en els pacients amb atàxia de Friedreich precedeix a la neurodegeneració del nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal, també anomenada columna de Clarke. Aquesta neurodegeneració es caracteritza per la pèrdua de les neurones grans sensibles d'aquesta regió de la medul·la espinal, les quals reben els axons dels DRG i envien la informació sensitiva i propioceptiva inconscient al cerebel.

Per tal d'analitzar aquesta zona de la medul·la espinal, es van realitzar tincions Nissl en seccions coronals de la medul·la espinal lumbar a l'alçada de la vertebra L2 de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg+ rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat. La tinció Nissl va permetre tenyir les neurones obtenint com a resultat una tinció púrpura pel citoplasma gràcies al marcatge dels cossos de Nissl, que són acumulacions de reticle endoplasmàtic rugós, i una tinció violeta pel nucli de les neurones. En les imatges obtingudes per microscòpia es va delimitar la zona corresponent al nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal amb un cercle de línia discontinua amb les mateixes dimensions per cadascuna de les seccions (**Figura 50A**).

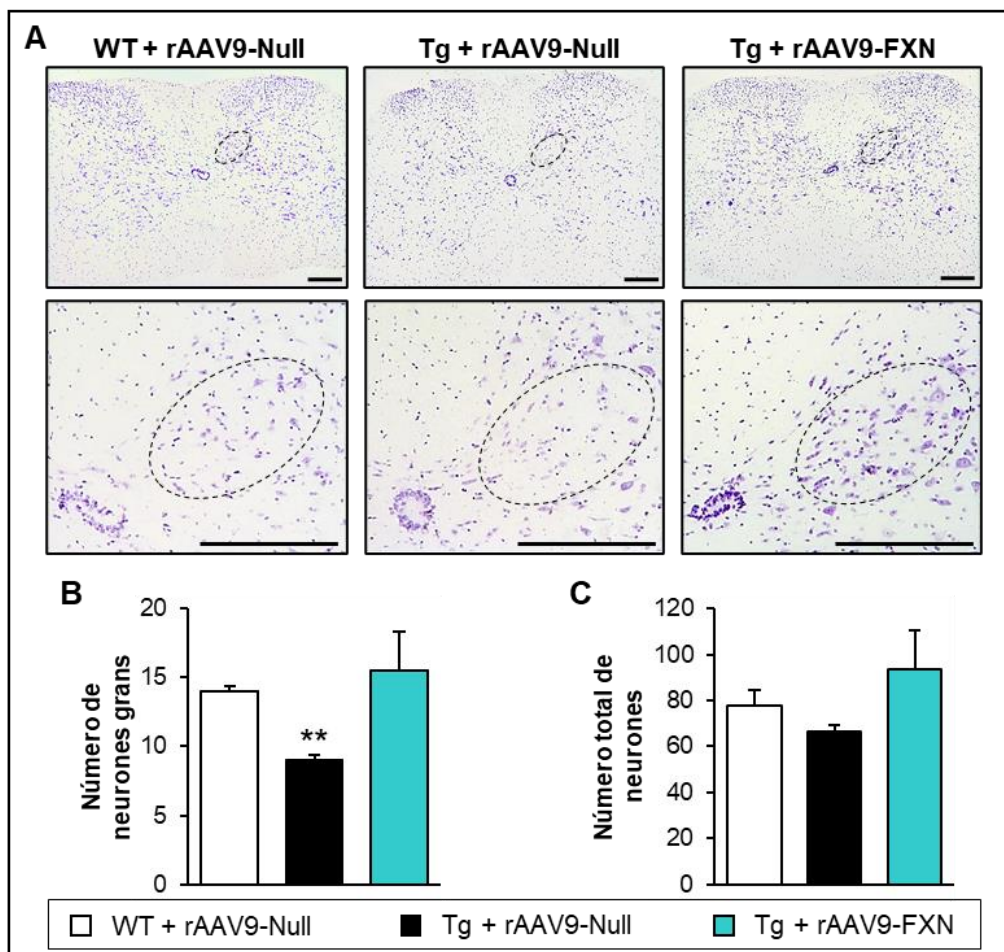


Figura 50. Anàlisi de la neuropatologia en la medul·la espinal dels ratolins YG8R tractats amb rAAV9-FXN. **A)** Imatges de seccions coronals de medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat tenyides amb tinció Nissl. Les imatges del panel superior mostren la medul·la espinal completa. Les imatges del panel inferior mostren l'ampliació de la zona central, incloent el conducte central com a referència. El cercle de línia discontinua marca la regió del nucli dorsal de la columna posterior. La barra d'escala indica 200 μ m. **B)** Quantificació del número de neurones grans (> 20 μ m de diàmetre) del nucli dorsal de la columna posterior. **C)** Quantificació del número total de neurones del nucli dorsal de la columna posterior. Es va analitzar 2 ratolins de cada grup (1 femella i 1 mascle). Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null.

La quantificació del número de neurones grans, amb més de 20 μ m de diàmetre, i el número total de neurones en el nucli dorsal de la columna posterior, va demostrar una reducció tant en el número de neurones grans com totals en els ratolins Tg + rAAV9-Null en comparació amb els ratolins WT + rAAV9-Null, essent estadísticament significatiu en el número de neurones grans [$F_{(2,3)} = 5,56, P = 0,004$]. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar una mitjana en el número de neurones grans i total més elevada que els ratolins Tg+ rAAV9-Null, inclús lleugerament per sobre dels ratolins WT + rAAV9-Null, però en canvi, no va ser estadísticament significativa deguda a la variabilitat mostrada entre ratolins del mateix grup [$F_{(2,3)} = 5,56, P = 0,066$] [$F_{(2,3)} = 1,69, P = 0,3$] (**Figura 50B-C**).

Per tant, es va demostrar que els ratolins transgènics hemizigots YG8R tenien una neurodegeneració del nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal, caracteritzada per una disminució en la densitat neuronal, sobretot de neurones grans; i que l'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN a les 10 setmanes d'edat prevé aquesta neurodegeneració en els ratolins YG8R fins als 14 mesos d'edat.

2.3. Anàlisi de les neurones grans del nucli dentat del cerebel.

En estadis més avançats de la malaltia sol aparèixer en els pacients amb atàxia de Friedreich neurodegeneració en el cerebel. Aquesta neurodegeneració es veu de manera més severa en la zona del nucli dentat, caracteritzada per una pèrdua de les neurones grans glutamatèrgiques.

Per avaluar l'afectació cerebel·losa en els ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN, es van tenyir seccions sagitals del cerebel amb tinció Nissl. Aquesta tinció va permetre realitzar un anàlisi qualitatiu de l'estructura del nucli dentat i la morfologia de les neurones del cerebel. Les imatges obtingudes per microscòpia van mostrar una pèrdua de tinció i un lleuger increment de la mida de les neurones grans en el nucli dentat cerebel·lós dels ratolins Tg + rAAV9-Null als 14 mesos d'edat comparat amb els ratolins WT + rAAV9-Null. La pèrdua

de tinció podria deures a la disgregació dels cossos de Nissl, anomenada cromatòlisis, que juntament amb el lleuger increment de la mida de les neurones grans del cerebel dels ratolins Tg + rAAV9-Null, són indicatives de l'inici de neurodegeneració i mort cel·lular per apoptosi. D'altra banda, el nucli dentat dels ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar un número, tinció i mida semblant de les neurones grans semblant a la que tenien els ratolins control WT + rAAV9-Null, i per tant diferent als ratolins Tg + rAAV9-Null (**Figura 51**).

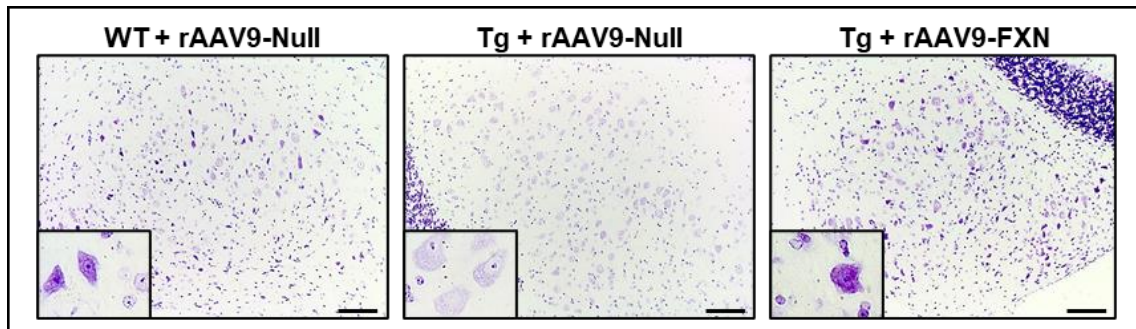


Figura 51. Avaluació de la neuropatologia en el nucli dentat cerebel·lós dels ratolins YG8R administrats amb rAAV9-FXN. Imatges de seccions sagitals del nucli dentat del cerebel de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat tenyides amb tinció Nissl. La barra d'escala indica 100 µm. Es va analitzar 2 ratolins de cada grup (1 femella i 1 mascle).

2.4. Anàlisi ultraestructural de les arrels dorsals de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

Els pacients amb FRDA mostren neurodegeneració en els nervis perifèrics caracteritzada per la pèrdua d'axons, la reducció en la mida d'aquests, i la desmielinització per la pèrdua de cèl·lules de Schwann. Per aquest motiu, es va avaluar la morfologia i ultraestructura de seccions ultrafines coronals d'arrels dorsals dels DRG lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat per microscòpia electrònica de transmissió (TEM).

Amb les imatges obtingudes es va quantificar la mida mitjana dels axons, mesurant l'àrea d'aquests, i l'àrea ocupada per la mielina. El ratolí Tg + rAAV9-Null va mostrar una disminució significativa de la mida dels axons i de la quantitat de mielina que els envoltava en comparació amb el ratolí control WT + rAAV9-Null [$F_{(2,3)} = 8,274, P = 0,047$] [$F_{(2,3)} = 7,038, P = 0,034$]. Concretament, la mesura de l'àrea dels axons mostrada pel ratolí Tg + rAAV9-Null va ser de $22,45 \mu\text{m}^2$, mentre que en el ratolí WT + rAAV9-Null va ser de $32,47 \mu\text{m}^2$. De la mateixa manera, la quantificació de l'àrea que ocupava la mielina va ser de $13,09 \mu\text{m}^2$ pel ratolí Tg + rAAV9-Null i $19,05 \mu\text{m}^2$ pel ratolí WT + rAAV9-Null. En canvi, els ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar una mida dels axons i àrea de mielina igual que els ratolins control WT + rAAV9-Null i diferent

estadísticament a la dels ratolins Tg + rAAV9-Null, amb valors de 32,57 μm^2 i 19,14 μm^2 , respectivament [$F_{(2,3)} = 13,075, P = 0,031$] [$F_{(2,3)} = 9,876, P = 0,017$] (**Figura 52B-C**).

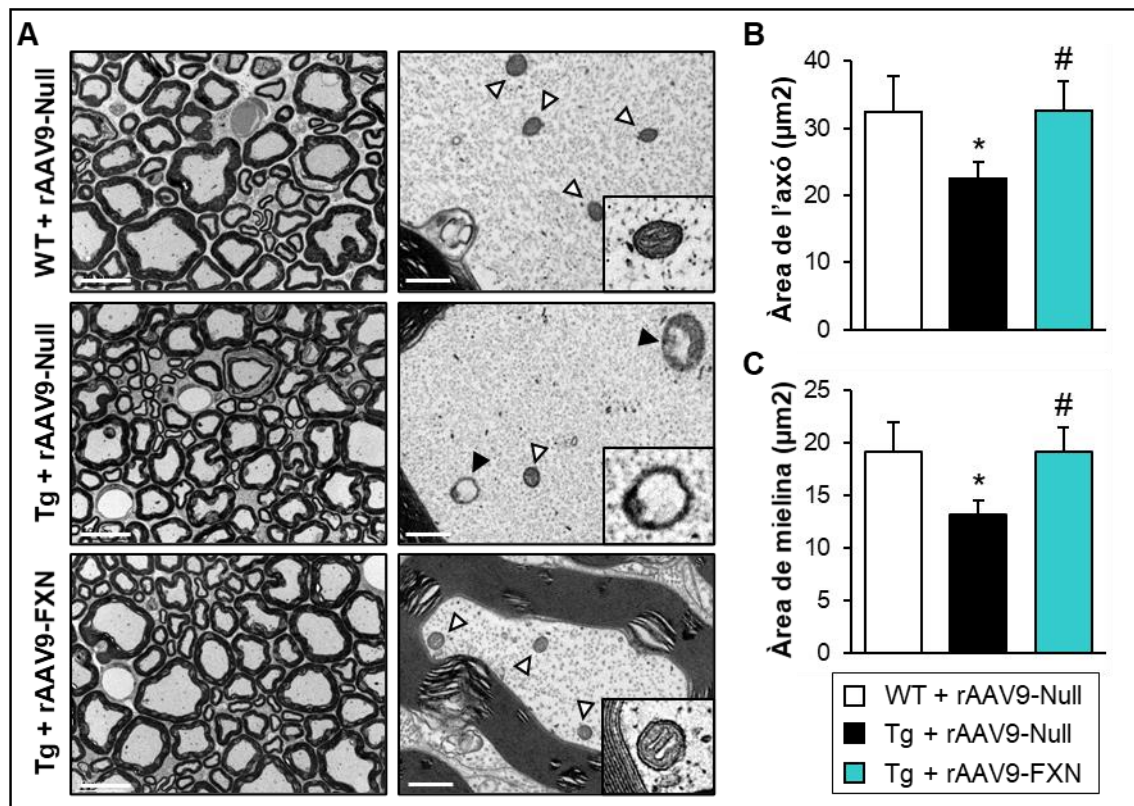


Figura 52. Anàlisi ultraestructural de les arres dorsals dels DRG de ratolins YG8R administrats amb rAAV9-FXN. A) Imatges adquirides per microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de talls coronals ultrafins de les arrels dorsals dels DRG d'un ratolí WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat. La barra d'escala en blanc indica 10 μm en les imatges de l'esquerra, i 100 μm en les imatges de la dreta. Les fletxes en blanc marquen mitocondries amb una morfologia normal. Les fletxes en negre indiquen mitocondries amb una morfologia anormal. Imatges amplificades de mitocondries representatives de cada ratolí es mostren en un requadre dins les imatges del panell dret. B) Quantificació de la mida mitjana dels axons. C) Quantificació de l'àrea que ocupa la mielina en els axons. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

Altrament, es van identificar mitocondries amb una morfologia anormal en els axons de les arrels dorsals dels ratolins Tg+ rAAV9-Null, caracteritzada per un engrandiment de la mida, i mostrant una matriu mitocondrial buida, amb les crestes disgregades i acumulades en els pols de la mitocondria. Aquestes característiques morfològiques no es va identificar en les mitocondries dels ratolins control WT + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN (**Figura 52A**).

Per tant, l'administració intratecal del vector rAAV9-FXN ens ratolins YG8R a les 10 setmanes d'edat prevé la neurodegeneració dels axons de les arrels dorsals dels DRG lumbar, evitant la

reducció de la mida dels axons, la pèrdua de mielina i l'aparició de mitocondries morfològicament anormals almenys fins als 14 mesos d'edat dels ratolins.

2.5. Avaluació de la cardiomiopatia dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

La cardiomiopatia està present en un alt percentatge dels pacients amb FRDA, provocant arrítmies i fallades cardíques, essent una dels principals causes de mort. Es caracteritza per una hipertròfia del ventricle esquerra del cor, en la qual inicialment s'engrosseixen les parets degut a la hipertròfia dels cardiomiòcits, i posteriorment a mesura que avança la malaltia, s'incrementa el volum del ventricle i apareix la fibrosi i mort dels cardiomiòcits, impeding el correcte bombeig de sang.

Per tal d'avaluar la cardiomiopatia, seccions coronals del cor de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat es van tenyir amb tinció hematoxilina-eosina. A partir de les imatges obtingudes per microscòpia d'aquesta seccions coronals tenyides, es van identificar en el cor de tots els ratolins, la paret del ventricle esquerra i del septe interventricular, que correspon a la paret que separa el ventricle esquerra i dret, i part del múscul papil·lar (**Figura 53A**).

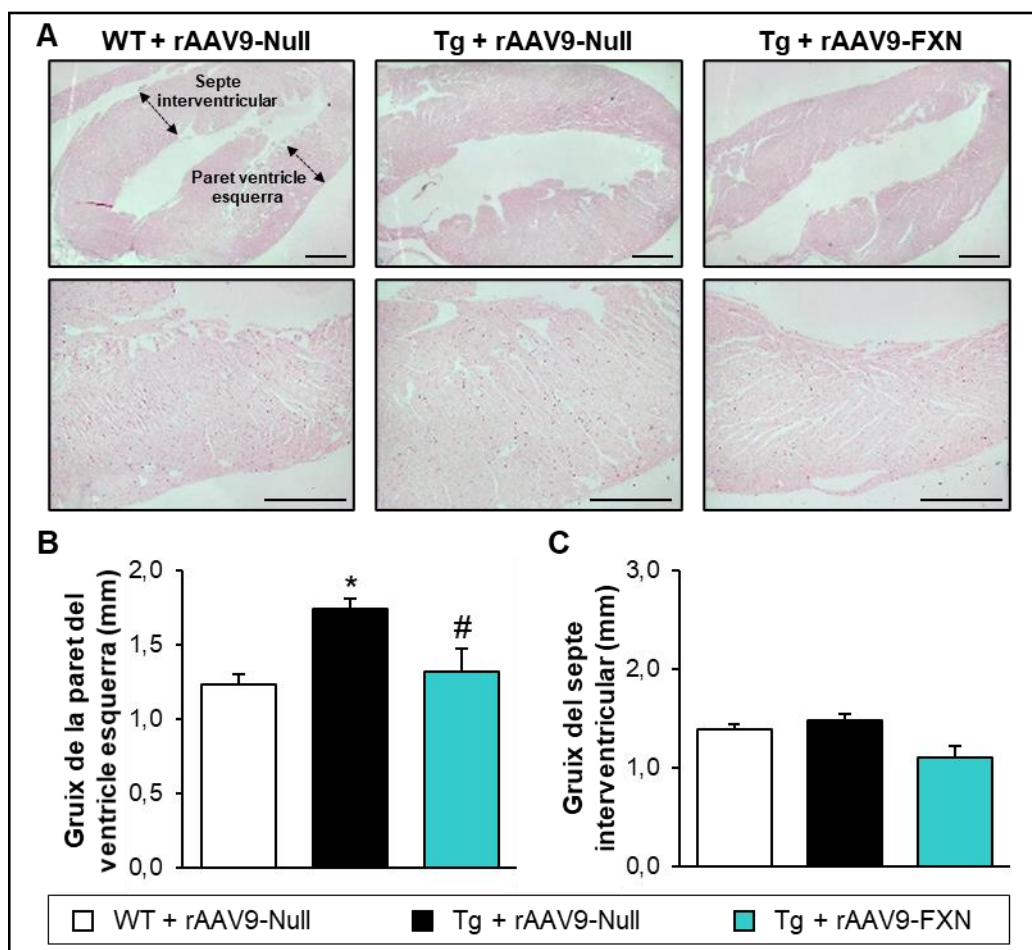


Figura 53. Avaluació estructural del ventricle esquerra del cor dels ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN. A) Imatges de tincions hematoxilina-eosina del ventricle esquerra del cor de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat. S'indica les parets del ventricle esquerra i el septe interventricular. Les imatges inferiors mostren la paret del ventricle esquerra ampliada. La barra d'escala indica 1 mm. B) Quantificació del gruix de la paret del ventricle esquerra. C) Quantificació del gruix del septe interventricular. Es van analitzar 4 ratolins de cada grup (2 femelles i 2 mascles). Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; # $P < 0,05$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

La mesura del gruix de la paret del ventricle esquerra i del septe interventricular va mostrar que els ratolins Tg+ rAAV9-Null tenien un increment significatiu en el gruix de la paret del ventricle esquerra, amb un valor mitjà de 1,738 mm respecte el dels ratolins control WT + rAAV9-Null amb 1,233 mm [$F_{(2,9)} = 6,678$, $P = 0,019$]. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN amb 1,314 mm no van mostrar aquest increment, mantenint-se similar al gruix dels ratolins WT + rAAV9-Null, i significativament diferents als ratolins Tg+ rAAV9-Null [$F_{(2,9)} = 6,678$, $P = 0,045$] (**Figura 53B**). En canvi, la mesura del gruix del septe interventricular del cor no va mostrar canvis significatius entre els diferents grups de ratolins. Tot i això, els ratolins Tg+ rAAV9-Null van mostrar el valor més elevat, que va ser de 1,486 mm, seguit pels WT + rAAV9-Null amb 1,398 mm, i finalment els ratolins Tg + rAAV9-FXN amb 1,1 mm (**Figura 53C**).

Una altra característica patològica del cor dels pacients amb atàxia de Friedreich és l'acumulació de ferro en forma d'agregats en els cardiomiòcits. Aquesta característica també es va detectar en el cor de ratolins transgènics YG22R amb més d'1 any d'edat mitjançant tinció Perls (192), i en el model YG8R, però als 18 mesos d'edat (631).

Per avaluar l'acumulació de dipòsits de ferro, les seccions coronals del cor de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg+ rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN es van tenyir amb tinció Perls, que marca les aglomeracions de ferro en color blau, i es van contratenyir amb roig neutral per poder observar el citoplasma dels cardiomiòcits. A partir d'imatges de microscòpia obtingudes d'aquestes seccions tenyides es va identificar l'acumulació de dipòsits de ferro en la paret del ventricle esquerra dels ratolins Tg+ rAAV9-Null. En canvi, no es va detectar la presència d'aquests agregats de ferro en els ratolins control WT + rAAV9-Null. D'altra banda, la paret del ventricle esquerra dels ratolins Tg + rAAV9-FXN en general no va mostrar dipòsits de ferro, o en una petita quantitat en alguna de les seccions analitzades, però significativament en menys quantitat que els ratolins Tg+ rAAV9-Null (**Figura 54**).

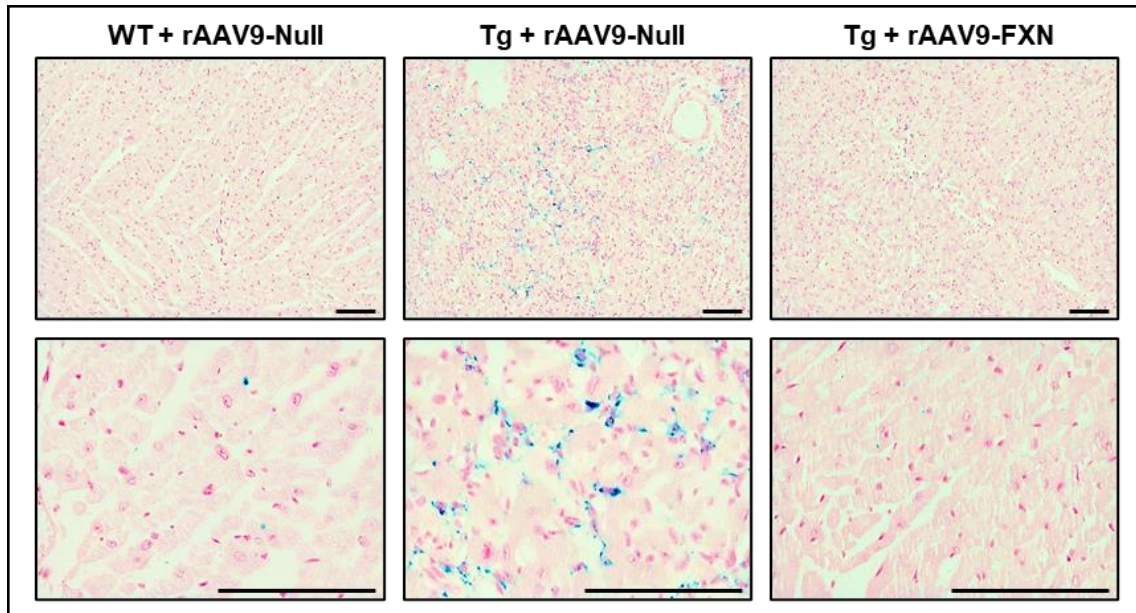


Figura 54. Avaluació de l'acumulació de dipòsits de ferro en el cor dels ratolins administrats amb el vector rAAV9-FXN. Imatges de microscòpia de seccions del cor tenyides amb tinció Perls de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat. Es mostra augmentat la paret del ventricle esquerra. Les barres d'escala indiquen 100 μm .

Per tant, l'administració intratecal del vector rAAV9-FXN va evitar l'engrossament de la paret del ventricle esquerra i va disminuir significativament l'acumulació de dipòsits de ferro del cor dels ratolins YG8R, prevenint la cardiomiopatia almenys fins als 12 mesos després de l'administració.

3. Anàlisi de la funció mitocondrial del ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

El dèficit de frataxina causa en les cèl·lules dels pacients amb FRDA una afectació en la funció mitocondrial caracteritzada per la desregulació del metabolisme del ferro, defectes en la producció energètica, estrès oxidatiu, i alteració de l'homeòstasi mitocondrial (63). Tenint en compte totes aquestes característiques es va dissenyar una sèrie d'assajos per tal d'avaluar l'efecte del tractament amb el vector rAAV9-FXN administrat intratecalment en els ratolins YG8R transgènics hemizigots per prevenir i restaurar la disfunció mitocondrial que podien manifestar els ratolins YG8R amb atàxia de Friedreich. Concretament, es va analitzar l'activitat dels complexos mitocondrials I i II de la cadena respiratòria mitocondrial, la capacitat de síntesi energètica mitjançant la quantificació d'ATP, i l'estrès oxidatiu a través de la quantificació de biomarcadors específics de peroxidació lipídica i de resposta antioxidant.

3.1. Anàlisi de l'activitat dels complexos de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria.

L'activitat dels complexos de la cadena transportadora d'electrons (ETC) es troba alterada en els pacients amb FRDA, ja que requereixen de centres Fe-S per poder desenvolupar la seva activitat, i aquests són deficients a causa de la falta de frataxina, generant en conseqüència l'acumulació de ferro en l'interior de la mitocòndria i l'alteració de la seva homeòstasi (16,153,207).

En els ratolins es va quantificar l'activitat dels complexos I i II de la cadena transportadora d'electrons a partir d'extracte de proteïna de mitocòndries aïllades de DRG lumbar i medul·la espinal lumbar de ratolins control WT + rAAV9-Null, ratolins YG8R transgènics hemizigots Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN, i homozigots (Tg/Tg) als 14 mesos d'edat mitjançant assajos enzimàtics mesurats a través de lectures espectrofotomètriques. Es van avaluar concretament els DRG lumbar i la medul·la espinal perquè a nivell neuropatològic es van trobar afectats en els ratolins YG8R Tg + rAAV9-Null quan es van comparar amb ratolins WT + rAAV9-Null (apartat 2.1 i 2.2 del capítol IV de resultats), i perquè són els que mostren més afectació en els pacients amb atàxia de Friedreich. Per tant si hi ha alteració de l'activitat dels complexos de l'ETC dels ratolins YG8R es veuria de manera més evident en aquests teixits.

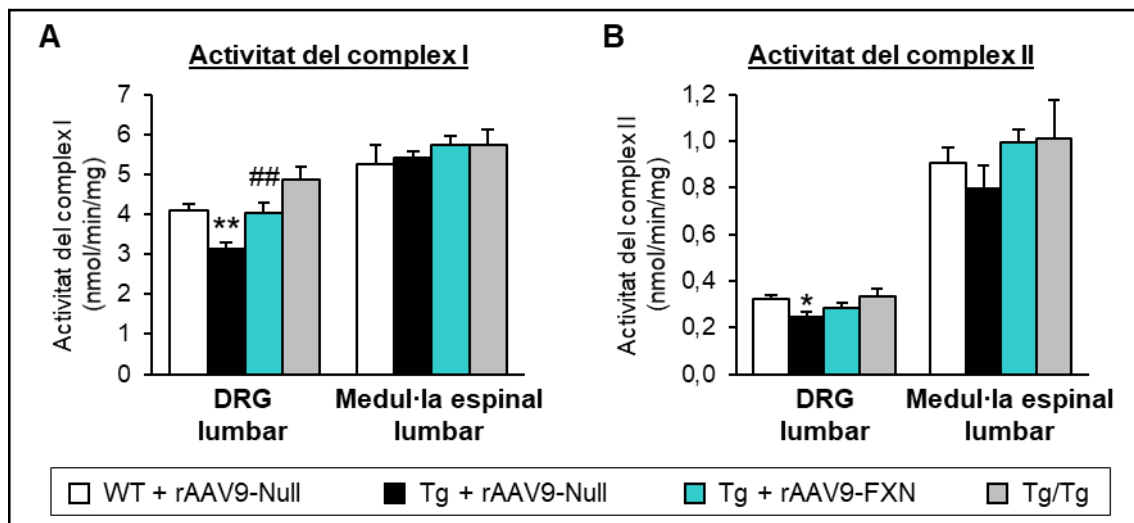


Figura 55. Anàlisi de l'activitat dels complexos I i II de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria de ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN. A) Mesura de l'activitat del complex I mitocondrial. **B)** Mesura de l'activitat del complex II mitocondrial. Es va analitzar els DRG i medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN i Tg/Tg de 14 mesos d'edat. L'activitat es va mesurar espectrofotometria en nmol/min/mg. Es van utilitzar 8 ratolins per cada grup, excepció els ratolins Tg/Tg que van ser 6. Les barres d'error representen el SEM. * $P < 0,05$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ** $P < 0,01$, WT + rAAV9-Null comparat amb Tg + rAAV9-Null; ## $P < 0,01$, Tg + rAAV9-FXN comparat Tg + rAAV9-Null.

En la quantificació de l'activitat del complex I, els ratolins Tg + rAAV9-Null van mostrar una reducció significativa de l'activitat en els DRG en comparació amb la resta de grups amb un valor de 3,29 nmol/min/mg [$F_{(2,28)} = 7,534, P = 0,005$]. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van presentar una activitat de 3,83 nmol/min/mg, molt similar a la dels ratolins WT + rAAV9-Null amb 3,98 nmol/min/mg, sent estadísticament més elevada que els ratolins Tg + rAAV9-Null [$F_{(2,28)} = 7,534, P = 0,009$]. Els ratolins control Tg/Tg, amb més expressió de frataxina van mostrar una activitat encara més elevada, de 4,88 nmol/min/mg. Per tant, els nivells de frataxina van correlacionar amb l'activitat del complex I en els DRG. D'altra banda, en la medul·la espinal no es van identificar diferències significatives entre cap dels grups de ratolins (**Figura 55A**).

En la quantificació de l'activitat del complex II en els DRG lumbar, els ratolins Tg + rAAV9-Null també van mostrar una reducció significativa, amb un valor de 0,25 nmol/min/mg d'activitat del complex II, en comparació amb els ratolins WT + rAAV9-Null amb 0,32 nmol/min/mg [$F_{(2,28)} = 3,347, P = 0,039$]. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN van mostrar la mateixa tendència observada en l'activitat del complex I, tenint nivells més elevats d'activitat que els ratolins Tg + rAAV9-Null, amb 0,28 nmol/min/mg, però en aquest cas, aquesta diferència no va ser estadísticament significativa [$F_{(2,28)} = 3,347, P = 0,405$]. Els ratolins Tg/Tg van mostrar una activitat més elevada, de 0,34 nmol/min/mg. En la medul·la espinal lumbar, l'activitat del complex II va seguir el mateix patró que en els DRG, sent més baixa en els ratolins Tg + rAAV9-Null respecte els WT + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN i més alta en els ratolins Tg/Tg. Malgrat això, no es van veure diferències significatives entre grups degut a la variabilitat observada (**Figura 55B**).

Per tant, els ratolins YG8R hemizigots únicament van mostrar afectació en l'activitat dels complexos I i II de la ETC en els DRG, i el tractament amb rAAV9-FXN va demostrar millorar significativament l'activitat del complex I de la ETC, i va mostrar una tendència per mantenir l'activitat del complex II, en els DRG dels ratolins YG8R hemizigots.

3.2. Avaluació de la capacitat de síntesi energètica.

La cadena transportadora d'electrons de la mitocondria s'encarrega de bombejar protons en l'espai intermembrana, creant un gradient amb la finalitat de que el complex V, ATP sintasa produeixi energia en forma d'ATP. Aquest sistema és la principal font de síntesi energètica en les cèl·lules, de manera que l'afectació d'aquest podria causar conseqüències greus en la mitocondria i en les cèl·lules amb alt requeriment energètic, tal com s'ha descrit que succeeix en els pacients amb atàxia de Friedreich (202,227). L'alteració de l'activitat i els nivells de proteïna dels complexos de la cadena respiratòria provoca una deficiència en la síntesi d'energia en determinants teixits, contribuint a la disfunció mitocondrial.

Donat que en els ratolins YG8R es va detectar una reducció en l'activitat dels complexos de la cadena transportadora d'electrons de la mitocòndria, principalment en els DRG lumbar, es van determinar els nivells d'ATP totals, ja que de la mateixa manera que en alguns teixits dels pacients amb FRDA, es podrien veure alterats en els ratolins YG8R hemizigots.

Els nivells d'ATP es van quantificar a partir d'extracte de total de proteïna de DRG i medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, ratolins transgènics hemizigots Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN, i Tg/Tg homozigots de 14 mesos d'edat. L'ATP es va determinar mitjançant la quantificació de la luminescència que resulta com a producte de la reacció de la luciferasa i els seus substrats, en la qual l'ATP n'és un dels substrats, actuant en aquest cas com a reactiu limitant, de manera que, la quantitat de fotons emesos com a producte d'aquesta reacció luminescent va ser proporcional a la quantitat d'ATP en els teixits analitzats.

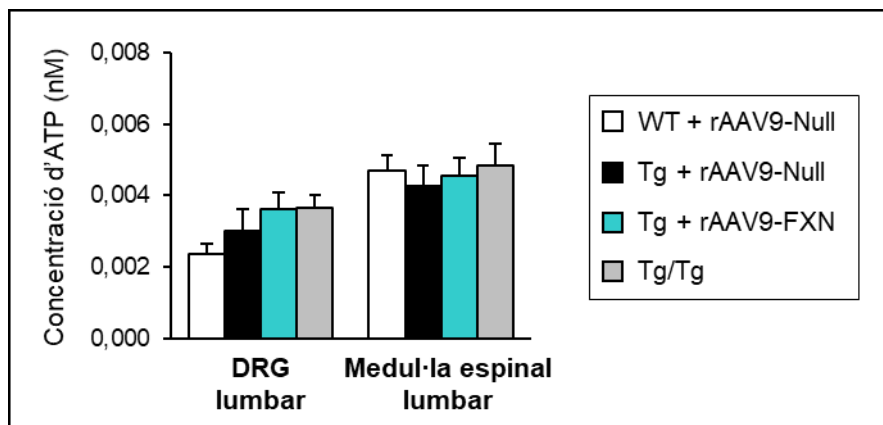


Figura 56. Determinació dels nivells d'ATP de ratolins YG8R administrats amb rAAV9-FXN. Es va analitzar els DRG i medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN i Tg/Tg de 14 mesos d'edat. Es va mesurar la concentració d'ATP (nM) a través d'un assaig de luminescència. Es van utilitzar 8 ratolins per cada grup, excepció els ratolins Tg/Tg que van ser 6. Les barres d'error representen el SEM.

No es van veure diferències significatives entre cap dels grups ni en els DRG ni en la medul·la espinal. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN que expressen frataxina recombinant en ambdós teixits, van tenir nivells una mica més elevats d'ATP que els ratolins Tg + rAAV9-Null, de manera semblant als ratolins Tg/Tg amb més expressió de frataxina. Malgrat això, el ratolí YG8R Tg + rAAV9-Null no van mostrar afectació patològica en els nivells d'ATP almenys en els teixits DRG i medul·la espinal lumbar quan es van comparar amb els ratolins WT + rAAV9-Null [$F_{(2,21)} = 1,738, P = 0,626$] [$F_{(2,21)} = 0,198, P = 0,81$], de manera que no es va poder determinar l'efecte terapèutic del vector rAAV9-FXN administrat intratecalment en els ratolins YG8R (Figura 56).

3.3. Anàlisi de l'estrès oxidatiu.

En l'atàxia de Friedreich s'ha vist que l'estrès oxidatiu ve determinat per una banda per l'acumulació de radicals lliures d'oxigen en l'interior cel·lular degut a una disminució de les defenses antioxidants (581), i d'altra banda, per la peroxidació lipídica que causa l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats dels lípids de les membranes i l'increment de proteïnes carbonilades (63,582). Prèviament, en aquesta tesi s'havia establert la quantificació dels nivells del producte aldehydic 4-hidroxinonenal (4-HNE), com a biomarcador de peroxidació lipídica, i la proteïna superòxid dismutasa 1 (SOD1), com a biomarcador de defensa antioxidant en l'atàxia de Friedreich, ja que s'havien vist alterats significativament en cèl·lules fibroblasts i medul·la espinal lumbar de pacients afectes (apartat 3.1 del capítol I de resultats).

Per poder analitzar l'estrès oxidatiu en els ratolins, es van avaluar per western-blot els nivells de 4-HNE i Sod1 a partir d'extractes de proteïna totals de DRG i medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat (**Figura 57A**).

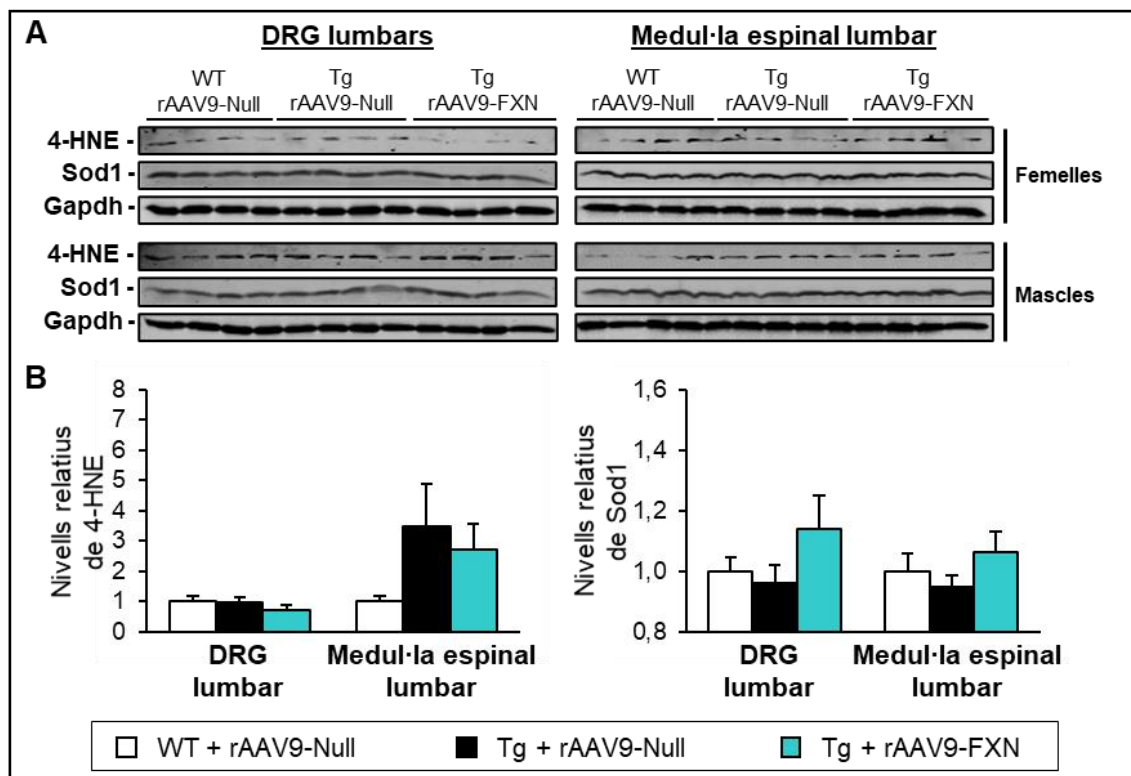


Figura 57. Anàlisi de l'estrès oxidatiu en teixits de ratolí YG8R administrat amb rAAV9-FXN. **A)** Es van analitzar els nivells de 4-HNE i Sod1 en els DRG i la medul·la espinal lumbar de ratolins WT + rAAV9-Null, Tg + rAAV9-Null i Tg + rAAV9-FXN de 14 mesos d'edat mitjançant western-blot. **B)** Quantificació dels nivells relatius d'expressió del producte 4-HNE (90 kDa) i la proteïna Sod1 (19 kDa) en els DRG i la medul·la espinal lumbar. El Gapdh es va utilitzar com a control de càrrega. Els valors d'expressió de les proteïnes analitzades de cada ratolí es van normalitzar respecte la mitjana dels ratolins

control WT + rAAV9-Null. Es van analitzar teixits de 8 ratolins de cada grup (4 femelles i 4 mascles). Les barres d'error representen el SEM.

La quantificació dels nivells de 4-HNE i de Sod1 no van mostrar-se diferents significativament entre cap dels grups de ratolins analitzats ni en els DRG ni en la medul·la espinal lumbar als 14 mesos d'edat. En la medul·la espinal lumbar, els ratolins Tg + rAAV9-Null, van mostrar una tendència incrementada en els nivells de 4-HNE respecte els ratolins WT + rAAV9-Null, que tot i tenir el mateix patró que la que s'havia vist en la medul·la espinal i fibroblasts dels pacients amb FRDA, no va ser significativa, degut a la variabilitat dels nivells entre ratolins dins del mateix grup [$F_{(2,20)} = 2,712, P = 0,078$]. Els ratolins Tg + rAAV9-FXN també van mostrar un increment dels nivells de 4-HNE respecte els WT + rAAV9-Null, tot i que menys pronunciat que els ratolins Tg + rAAV9-Null, suggerint una tendència terapèutica del tractament amb el vector rAAV9-FXN per intentar disminuir aquests nivells elevats de 4-HNE (**Figura 57B**).

La quantificació dels nivells relatius de Sod1 no van evidenciar canvis significatius en els ratolins Tg + rAAV9-Null, tot i mostrar nivells més baixos de Sod1 respecte els ratolins WT + rAAV9-Null tant en els DRG lumbar [$F_{(2,21)} = 1,558, P = 0,877$], com en la medul·la espinal lumbar [$F_{(2,21)} = 1,045, P = 0,817$]. En canvi, els ratolins Tg + rAAV9-FXN van expressar nivells superiors tant als ratolins Tg + rAAV9-Null com WT + rAAV9-Null, que tampoc van ser estadísticament significatius, però van suggerir que el tractament de teràpia gènica podria incrementar els nivells de Sod1, augmentant la resposta antioxidant en aquests teixits, ja que es va observar el mateix patró tant en els DRG com en la medul·la espinal lumbar (**Figura 57B**).

Els resultats obtinguts van indicar que els biomarcadors d'estrès oxidatiu 4-HNE i Sod1 avaluats en els ratolins YG8R, no es veuen alterats a l'edat de 14 mesos d'edat. En els pacients amb FRDA, l'estrès oxidatiu acostuma a aparèixer en estadis avançats de la malaltia i no tots els tipus cel·lulars el manifesten de la mateixa manera (571). Per tant, donat que aquest model de ratolí YG8R té una patologia més moderada i de progressió més lenta (192,289), sumat a la tendència patològica observada en aquest estudi amb els biomarcadors 4-HNE i Sod1, suggereix la possibilitat de que aquests mateixos biomarcadors d'estrès oxidatiu es vegin afectats a una edat més avançada que els 14 mesos d'edat. Això genera la necessitat d'expandir aquest estudi per poder avaluar l'efecte del tractament en aquest aspecte en els ratolins YG8R, així com identificar nous biomarcadors d'estrès oxidatiu alterats en els ratolins YG8R.

DISCUSSIÓ

L'atàxia de Friedreich és una malaltia neurodegenerativa, hereditària autosòmica recessiva, caracteritzada per la deficiència de la proteïna frataxina. La causa genètica més freqüent és una expansió en homozigosi del triplet de repeticions GAA en l'intró 1 del gen *FXN*. La deficiència de frataxina provoca la pèrdua de les fibres sensibles dels nervis perifèrics i la neurodegeneració dels DRG, les columnes posteriors de la medulla espinal i el nucli dentat del cerebel. La malaltia típicament s'inicia durant la primera o la segona dècada d'edat, i es manifesta amb una atàxia progressiva, pèrdua sensorial, signes d'afectació piramidal, disàrtria, debilitat muscular i cardiomiopatia, entre altres. La progressió patològica del conjunt d'aquests símptomes, especialment els neurològics, comprometen severament l'autonomia dels pacients, confinant-los a estar en cadira de rodes.

Des de que es va descriure que l'atàxia de Friedreich era causada per una deficiència en els nivells de la proteïna frataxina el 1996 (15), s'han anat desenvolupant estudis per trobar un tractament efectiu per curar, aturar o revertir la progressió dels símptomes fisiopatològics característics de la malaltia. Molts d'aquests tractaments es van focalitzar en augmentar els nivells de la proteïna frataxina, ja fos per exemple intentant incrementar l'expressió del gen *FXN* o utilitzant compostos potenciadors o estabilitzadors de la frataxina (22). En canvi, altres tractaments es van centrar en pal·liar les conseqüències de la deficiència de frataxina com l'estrès oxidatiu, l'acumulació de ferro i la disfunció mitocondrial (22). Malgrat això, a dia d'avui, cap d'ells ha resultat eficaç per curar la malaltia. Per aquesta raó, es fa necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per al tractament d'aquesta malaltia.

En els darrers anys, la teràpia gènica amb AAV s'ha postulat com una aproximació terapèutica eficaç per algunes malalties neurodegeneratives, gràcies a la capacitat d'aquests vectors per proveir una expressió a llarg termini del gen terapèutic en molts tipus cel·lulars i especialment neurones del sistema nerviós sense mostrar patogenicitat i una baixa immunogenicitat, tal com demostren els nombrosos assajos clínics que actualment s'estan desenvolupant (583). Diverses proves de concepte han evidenciat el potencial terapèutic de la teràpia gènica amb AAV per a la FRDA (283,367–369). No obstant, aquests estudis han utilitzat vies d'administració dels AAV ineficients per tractar la neurodegeneració i han utilitzat promotors sintètics que proporcionen nivells molt elevats de FXN, els quals s'han descrit recentment que causen toxicitat cel·lular (550).

En aquesta tesi es va desenvolupar, implementar i avaluar una nova estratègia de teràpia gènica basada en un vector viral adenoassociat, per tal d'augmentar els nivells de frataxina en les cèl·lules diana deficitàries de la proteïna a uns nivells segurs, no tòxics i potencialment terapèutics, i així tractar a nivell preclínic, les característiques patològiques de l'atàxia de Friedreich en un model de ratolí amb la malaltia.

Identificació de nous llocs potencials de regulació del gen FXN.

L'estudi de conservació i caracterització del gen *FXN* va permetre identificar noves regions potencialment reguladores que es podrien utilitzar per regular l'expressió de frataxina de cara al desenvolupament d'una teràpia gènica. Dins de la regió promotora de 5 kb i l'intró 1 del gen *FXN*, es van determinar zones altament conservades filogenèticament, en les quals es van identificar 20 llocs potencials d'unió de factors de transcripció no descrits, que poden participar en la regulació del gen, a més dels 5 que ja s'havien descrit anteriorment en aquestes mateixes regions, i que han demostrat la seva contribució en l'expressió del gen (107,114,120–122). En la regió 3'UTR del gen *FXN*, on ja s'han descrit uns 20 ARNm que s'uneixen i que regulen els transcrits de *FXN* (568,569,584,585), es van identificar 95 nous llocs d'unió potencials d'ARNm, localitzats majoritàriament en els primers 400 pb, els quals estan altament conservats evolutivament en comparació amb la resta de seqüència 3'UTR, suggerint la importància particularment d'aquesta zona en la regulació posttranscripcional del gen *FXN*.

Determinació dels nivells de frataxina necessaris per obtenir un efecte terapèutic.

Per dissenyar un tractament de teràpia gènica eficaç per a l'atàxia de Friedreich es van quantificar els nivells d'expressió de frataxina que presenten els pacients afectats respecte els individus portadors de la mutació, que són asimptomàtics, per tal d'establir els nivells mínims necessaris de frataxina que cal assolir en les cèl·lules dels pacients amb FRDA per tenir un efecte potencialment terapèutic.

En cèl·lules fibroblasts es van identificar uns nivells d'expressió relatius d'ARNm de frataxina del 27% en pacients amb atàxia de Friedreich, en comparació amb el 52% que expressaven els individus portadors. En canvi, en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina van ser del 7% en els pacients afectes i del 29% en els individus portadors. Aquests resultats van demostrar la necessitat d'incrementar com a mínim un 22% i un 25% els nivells relatius d'expressió d'ARNm de frataxina que tenen els pacients amb atàxia de Friedreich en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica i fibroblasts, respectivament, per tal d'aconseguir els nivells d'expressió no patològics dels individus portadors asimptomàtics. Aquests percentatges van ser molt similars entre ambdós tipus cel·lulars, indicant tenir el mateix requeriment de frataxina, tot i la diferència en els nivells relatius endògens d'ARNm de frataxina que presenten entre si, tant en els pacients afectes com en els individus portadors.

La quantificació relativa dels nivells d'expressió de proteïna frataxina en cèl·lules fibroblasts va permetre definir que els pacients amb atàxia de Friedreich expressen uns nivells endògens relatius del 17% de frataxina, mentre que els individus portadors tenen un 28%, ambdós comparats respecte els individus no portadors en aquest tipus cel·lular. Per tant, aquests resultats van

demostrar que és necessari incrementar com a mínim un 11% els nivells d'expressió de proteïna frataxina en les cèl·lules fibroblasts dels pacients amb FRDA, per assolir els nivells d'expressió no patològics i així tenir un efecte potencialment terapèutic que permeti aturar i/o revertir a nivell molecular, cel·lular i fenotípic l'atàxia de Friedreich.

Determinació de biomarcadors moleculars patològics per a l'avaluació de l'eficàcia del tractament de teràpia gènica.

L'avaluació dels nivells d'expressió de proteïnes mitocondrials i de l'estrès oxidatiu en cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA va servir per caracteritzar la patologia a nivell molecular de l'atàxia de Friedreich i establir biomarcadors per la posterior avaluació del tractament de teràpia gènica en el model de ratolí amb la malaltia.

En cèl·lules fibroblasts i medul·la espinal lumbar de pacients amb FRDA es va identificar una disminució significativa dels nivells d'expressió de la proteïna mitocondrial VDAC1. Aquesta disminució, que tan sols s'havia descrit en un model cel·lular deficient de frataxina (586), mai s'havia identificat en fibroblasts ni medul·la espinal lumbar de pacients amb FRDA, suggerint una disminució en el número de mitocondries funcionals d'aquestes cèl·lules, que es va confirmar amb l'anàlisi ultraestructural per criomicroscòpia tomogràfica de raigs X. Curiosament, aquesta disminució també es va veure en els fibroblasts dels individus portadors, ja que els nivells de VDAC1 s'han descrit que correlacionen amb els nivells de frataxina (570), i els individus portadors asimptomàtics presenten una disminució significativa dels nivells de frataxina en comparació amb els individus no portadors.

La quantificació dels nivells relatius del producte alhídric 4-hidroxinonenal (4-HNE) i la proteïna superòxid dismutasa 1 (SOD1) indiquen l'increment de la peroxidació lipídica i la disminució de les defenses antioxidants, confirmant la presència d'estrès oxidatiu en les cèl·lules fibroblasts i medul·la espinal dels pacients amb FRDA (193,317,582). Això va servir per establir la quantificació de 4-HNE i SOD1 com a biomarcadors d'estrès oxidatiu característics de la malaltia, i així poder avaluar l'efecte del tractament de teràpia gènica sobre aquest aspecte en el model de ratolí YG8R.

Alteracions morfològiques i estructurals de les mitocondries mitjançant criomicroscòpia tomogràfica de raigs X.

Fins l'actualitat, els estudis estructurals i morfològics en cèl·lules deficientes en frataxina s'havien realitzat amb tècniques histològiques o per microscòpia electrònica de transmissió, que permeten un anàlisi bidimensional de la cèl·lula. L'estudi realitzat per criomicroscòpia tomogràfica de raigs X en el sincrotró ALBA va permetre visualitzar i analitzar l'estructura subcel·lular de cèl·lules

de pacients amb atàxia de Friedreich de manera tridimensional com abans mai s'havia vist. Això va permetre identificar un increment significatiu de mitocondries que adquireixen una morfologia anormal concretament en cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA. Aquesta morfologia es caracteritza per un engrandiment de la seva mida, de gairebé el doble del volum, amb 1 μm aproximadament de diàmetre, i la disrupció de les membranes de les crestes mitocondrials, de manera que n'hi ha que presenten menys densitat de crestes, i d'altres la matriu completament buida, amb les crestes disgregades i acumulades en els pols de la mitocondria. Aquesta mateixa alteració de la morfologia mitocondrial anormal correlaciona amb la que s'ha vist en altres malalties neurodegeneratives com Parkinson (587), Alzheimer (588), ELA (589), i és indicativa d'una patologia mitocondrial severa, estretament relacionada amb la disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu (590), que són característics en l'atàxia de Friedreich (573,591). A més, aquestes característiques morfològiques han demostrat ser un factor principal de mort cel·lular sobretot a través d'apoptosi i necrosi (592,593).

En l'atàxia de Friedreich, tan sols s'havia descrit la presència de mitocondries amb una morfologia anormal en models experimentals deficients de frataxina (194,572,573), així com adipòcits, hepatòcits, cardiomiòcits i neurones dels DRG de diferents models de ratolí (283,290,367,586,591), però en pacients amb FRDA únicament en limfoblasts (233). Per tant, en aquest estudi es va demostrar per primera vegada la presència de mitocondries morfològicament anormals en cèl·lules fibroblasts de pacients amb atàxia de Friedreich.

L'avaluació tridimensional a partir de les imatges obtingudes per criomicroscòpia tomogràfica de raigs X de les cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA, va permetre obtenir una visió molt més àmplia de les cèl·lules. D'aquesta manera, a banda d'identificar tan sols l'estructura i la morfologia mitocondrial que és el que s'havia fet fins ara per l'atàxia de Friedreich, es van determinar percentatges de poblacions mitocondrials que van demostrar un increment significatiu del 25% de mitocondries morfològicament anormals en les cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA respecte els individus sans tant portadors com no portadors.

Interessantment, dins de la mateixa cèl·lula fibroblast d'un pacient amb atàxia de Friedreich es va identificar poblacions mitocondrials amb morfologia anormal diferent. D'aquestes, totes tenien un increment de la seva mida però algunes mantenien definides les crestes mitocondrials, mentre que altres presentaven una matriu completament buida. Això, suggereix un procés progressiu de degeneració estructural de la mitocondria en les cèl·lules de pacients amb FRDA, que s'inicia amb l'increment de volum, mantenint les crestes mitocondrials visibles i definides, però continua amb la pèrdua de densitat i separació de les crestes, i progressivament a banda de seguir incrementant el volum, succeeix la disrupció d'aquestes, obtenint al final una matriu buida, sense crestes, les quals acaben acumulant-se en els pols de la mitocondria (592,594).

Les causes directes de la pèrdua de la morfologia mitocondrial en aquestes cèl·lules fibroblasts dels pacients amb atàxia de Friedreich poden ser degudes a diversos factors àmpliament descrits en malalties neurodegeneratives amb afectació mitocondrial, que serien en aquest cas, desencadenades per la deficiència de frataxina i les conseqüències que comporta com els defectes en la síntesi d'energia, la pèrdua de l'homeòstasi iònica del ferro i el calci, i l'estrès oxidatiu. Per una banda, s'ha proposat que l'engrandiment de les mitocòndries pot ser degut a l'alteració dels mecanismes de fusió i fissió que regulen l'homeòstasi mitocondrial identificats a la FRDA (573). D'altra banda, s'ha plantejat que aquest increment de la mida de les mitocòndries podria ser provocat per l'obertura desmesurada i prolongada de porus mitocondrials com VDAC1 i el porus transitori de permeabilitat mitocondrial (mPTP), localitzats en les membranes mitocondrials externa i interna respectivament. D'aquesta manera, s'intercanvien soluts i metabòlits entre la mitocòndria i el citosol, per intentar mantenir l'homeòstasi mitocondrial, en resposta a l'estrès oxidatiu, el requeriment energètic i l'elevat contingut de calci en l'interior de la mitocòndria (246,572,595). En aquest cas, l'obertura prolongada d'aquests porus permetria l'entrada de soluts i metabòlits en l'interior de la mitocòndria, causant l'increment de la pressió osmòtica i augmentant en conseqüència el seu volum. La disrupció de les crestes mitocondrials observada en les imatges 3D de les cèl·lules fibroblasts obtingudes per microscòpia tomogràfica de raigs X podria ser deguda a l'estrès oxidatiu, i més concretament a l'increment de peroxidació lipídica que s'ha demostrat en aquesta tesi en les mateixes cèl·lules fibroblasts de pacients amb atàxia de Friedreich, ja que s'ha descrit que aquesta altera l'estabilitat i estructura particularment de la membrana mitocondrial interna que formen les crestes, conduint finalment a la seva disrupció i acumulació en els pols de la mitocòndria (596,597).

En definitiva, aquest estudi va demostrar que la deficiència de frataxina en cèl·lules de pacients amb atàxia de Friedreich, no neurològiques com ho són els fibroblasts, provoca un increment significatiu de mitocòndries que adquireixen una morfologia anormal que es caracteritza per un increment de volum i la progressiva pèrdua de les crestes mitocondrials, que està lligada amb la patologia i disfunció mitocondrials.

Generació d'un nou vector de teràpia gènica AAV per tractar l'atàxia de Friedreich.

El constructe d'expressió que es va sintetitzar format pel promotor humà de la fosfoglicerat quinasa 1 (PGK), la seqüència Kozak consens, la seqüència d'ADN codificant de la isoforma 1 de la proteïna frataxina humana (FXN) juntament amb l'hemaglutinina (HA), l'element regulador posttranscripcional (WPRE) i la senyal de poliadenilació de l'hormona de creixement bovina (bGH PA) va demostrar ser eficient per expressar la proteïna frataxina recombinant en cèl·lules neuronals i no neuronals humanes i de ratolí, en uns nivells aproximats als que expressaven endògenament les pròpies cèl·lules.

Es va utilitzar la seqüència d'ADN codificant de la frataxina humana enlloc de la de ratolí perquè tot i realitzar l'estudi preclínic en ratolins, l'estratègia de teràpia gènica que es va desenvolupar pretén que sigui translacional. De manera que si es mostrava eficiència en els ratolins en la prova de concepte preclínica, el tractament tindria potencial per ser efectiu en humans. Pel mateix motiu, es va utilitzar el promotor humà de la fosfoglicerat quinasa 1 (PGK) enlloc del murí. Per això, inicialment es va fer un estudi comparatiu entre la frataxina humana i murina, per saber si la frataxina humana tenia capacitat per desenvolupar la mateixa funció que la frataxina murina, i per tant, conèixer si la seva addició en el model de ratolí, era potencialment terapèutica. L'avaluació de la identitat de la seqüència de la part C-terminal de la frataxina, la qual s'ha descrit que correspon a la forma madura i és la part funcional de la proteïna (146–148,598), va demostrar ser elevada, amb una identitat superior al 90% entre ambdós proteïnes frataxina. En canvi, en la part N-terminal, tot i mostrar poca conservació entre la frataxina humana i ratolí, amb només un 42,5% d'identitat, van demostrar ambdós contenir la seqüència de localització mitocondrial. Per tant, aquestes característiques en comú entre la frataxina humana i de ratolí, van suggerir que la proteïna frataxina humana tenia capacitat per translocar-se a la mitocondria, madurar i desenvolupar la mateixa funció que la frataxina murina en les cèl·lules del ratolí. Prova d'això, és que la frataxina humana rescata de la mort embrionària precisament els models de ratolí YG8R i YG22R que són KO per la frataxina murina i transgènics amb el gen humà *FXN* (192).

La inclusió en el constructe d'expressió de l'element regulador posttranscripcional WPRE i la seqüència Kozak consens estava justificada degut a que ambdós elements van demostrar contribuir a una millora de l'expressió de proteïna frataxina recombinant, proporcionant respectivament estabilitat a l'ARNm de frataxina recombinant i un increment del reconeixement del ribosoma per aquest ARNm de frataxina durant la síntesi de la proteïna frataxina, tal com havien demostrat en diferents estudis d'expressió d'altres proteïnes recombinants (369,512,527–530,575,599,600).

Com a senyal de poliadenilació es va utilitzar la seqüència de la hormona de creixement bovina (bGH PA) perquè s'ha utilitzat àmpliament en constructes de teràpia gènica i ha demostrat que proporciona una elevada estabilitat en l'ARNm en comparació amb altres senyals de poliadenilació que s'han provat fins la data (512,523–525,574).

Pel que fa al promotor, es va descartar l'ús dels promotors neuronals sinapsina i enolasa, així com del promotor endogen del gen que codifica la frataxina, per la seva baixa capacitat, demostrada en aquest estudi, per expressar a uns nivells òptims necessaris la frataxina recombinant. En el cas dels promotors neuronals, també perquè únicament podien expressar la frataxina en neurones, quan l'atàxia de Friedreich és una malaltia multisistèmica, amb deficiència en tots els tipus cel·lulars analitzats i afectació també en òrgans sistèmics com el cor i el pàncreas. En el cas del promotor endogen de frataxina, aquesta baixa expressió va ser deguda a la falta d'inclusió de

zones reguladores importants del gen *FXN*, com les que s'han identificat en aquesta tesi. Per tant, aquesta baixa expressió va demostrar la complexitat reguladora que té el gen, en el qual no sòls la regió promotora de 1.255 pb inclosa en el constructe participa en la regulació, sinó que també ho fa l'intró 1, regions a 5 kb en la zona promotora abans del codó d'inici de traducció i inclús la regió 3'UTR (114,121,122). En canvi, el promotor del citomegalovirus (CMV) va demostrar proveir una expressió molt elevada de frataxina en cultius cel·lulars *in vitro*, concretament entre 40 i 60 vegades superior als nivells endògens de les pròpies cèl·lules. La implementació d'aquest tipus de promotors en teràpies gèniques d'addició és qüestionable, ja que la sobreexpressió significativa de les proteïnes recombinants exògens causen toxicitat a les cèl·lules hoste, com és el cas de la frataxina, que uns nivells entre 6 i 10 vegades superiors als endògens, causen toxicitat cel·lular (268,269,550–552). A aquest aspecte, se li suma que el promotor CMV és d'origen viral, fet que provoca que les cèl·lules de mamífer el metilin per inactivar-lo com a mecanisme de defensa, de manera que es silencia amb el pas del temps evitant l'expressió de llarga durada de la proteïna recombinant (402,515,519,529). Aquest conjunt de factors van descartar l'ús del promotor CMV en el constructe d'expressió per al tractament de teràpia gènica per l'atàxia de Friedreich. De la mateixa manera, els promotors sintètics de forta potència d'expressió com és el CAG, tot i no ser inactivats per metilació, tenen la capacitat per expressar nivells similars del gen terapèutic als que expressa el promotor CMV (522,550,574,601,602). Això compromet l'escalabilitat dels tractaments de teràpia gènica que s'han realitzat fins avui en dia a nivell preclínic per a la FRDA, ja que tots han utilitzat el promotor CAG per regular l'expressió de frataxina, i tot i demostrar efectes terapèutics en determinats tipus cel·lulars i una millora fenotípica en ratolins KO condicionals (283,367–369), els mateixos autors han descrit que poden causar toxicitat cel·lular per sobreexpressió de frataxina (550).

D'aquesta manera, el promotor humà PGK, que s'havia descrit com un promotor constitutiu, ubic, metabòlic, capaç de proveir una expressió moderada i de llarga durada del gen terapèutic (521,522,576,577), combinat amb la resta d'elements reguladors inclosos en el constructe d'expressió, va demostrar ser capaç d'expressar frataxina tant en cèl·lules neuronals com no neuronals humanes i de ratolí; en uns nivells moderats, similars als nivells endògens que expressa cada tipus cel·lular; segurs, ja que són inferiors als nivells de sobreexpressió de frataxina que s'han descrit que poden causar toxicitat en les cèl·lules; i prou elevats com per tenir un efecte potencialment terapèutic en les cèl·lules diana deficientes en frataxina, d'acord amb els nivells que s'ha vist que necessitaven els pacients amb FRDA per arribar a tenir els nivells mínims no patològics de frataxina que expressen els individus portadors. Per tant, la combinació d'elements formada pel promotor PGK, la seqüència Kozak, la seqüència d'ADN codificant de *FXN*, l'element WPRE i la senyal de poliadenilació bGH PA va permetre expressar la proteïna frataxina

dins d'un rang fisiològic segur, no tòxic, similar als nivells endògens no patològics i per tant amb potencial terapèutic.

Biodistribució in vivo dels vectors virals rAAV9 amb una administració intratecal en els ratolins YG8R.

Tots els teixits que es van analitzar per bioluminescència van mostrar expressió de luciferasa i per tant van demostrar l'àmplia biodistribució, tropisme i capacitat de transducció dels rAAV9 generats quan s'administren intratecalment en els ratolins seguint el mateix patró de biodistribució descrit per l'AAV9 (445,466,496,498,603–605). També va servir per confirmar que el promotor PGK, juntament amb la resta dels elements reguladors introduïts en el constructe d'expressió dels vectors rAAV9, eren capaços de proveir una expressió *in vivo* ubiqua, multisistèmica i substancial de proteïna recombinant, en aquest cas de luciferasa.

Els ratolins WT i YG8R hemizigot administrats intratecalment amb el vector rAAV9-LUC a les 10 setmanes d'edat van mostrar la mateixa biodistribució en l'assaig de bioluminescència, tenint expressió de luciferasa en tots els òrgans analitzats. Tot i això, en alguns òrgans com sobretot el cervell, el pàncreas i els pulmons es va mostrar variabilitat en la intensitat d'expressió de luciferasa entre ratolins. Malgrat analitzar-se únicament 1 ratolí de cada genotip, es va descartar que aquestes diferències fossin provocades per un canvi de tropisme dels vectors rAAV9 a causa de la patologia que desenvolupen els YG8R, ja que no s'ha descrit que a les 10 setmanes d'edat, que va ser quan es van administrar els rAAV9, aquests ratolins es trobessin afectes i tinguessin mort cel·lular o degeneració que pogués canviar l'eficiència de transducció viral en comparació amb la que mostraven els ratolins WT (192,287). Aquestes diferències d'intensitat d'expressió de luciferasa en alguns teixits es van atribuir a l'alta variabilitat ja descrita que mostren els AAV a l'hora d'expressar el transgèn en cadascuna de les cèl·lules transduïdes (462,512). Per tant, es va determinar que l'administració intratecal dels vectors rAAV9 a les 10 setmanes d'edat manté intacta la capacitat de biodistribució, transducció cel·lular i capacitat d'expressió dels elements reguladors inclosos en el vector viral en els ratolins YG8R.

L'assaig de bioluminescència va demostrar una expressió robusta de luciferasa en tots els teixits del sistema nerviós analitzats, el qual era el propòsit principal de l'administració intratecal, ja que d'aquesta manera es va aconseguir travessar mecànicament la barrera hematoencefàlica, permetent la difusió dels vectors rAAV9 a través del líquid cefalorraquidi, facilitant la transducció dels diferents tipus cel·lulars de tots els teixits nerviosos, des de la medul·la espinal, fins al còrtex cerebral, i passant pel tronc cerebral i el cerebel seguint el patró de biodistribució que s'havia observat anteriorment en altres estudis (467,496,498,603,604). D'aquesta manera, els vectors rAAV9 generats van demostrar la capacitat per transduir eficientment i expressar potencialment frataxina en les cèl·lules diana que principalment degeneren i moren en l'atàxia de Friedreich.

Tot i això, en la medul·la espinal l'expressió de luciferasa obtinguda va ser més elevada que el conjunt cervell, cerebel i tronc cerebral. Això va ser degut principalment a que l'administració intratecal es va realitzar en la zona lumbar de la columna vertebral, per tant va ser el teixit més pròxim al lloc d'administració, i conseqüentment amb més capacitat per ser transduït. Aquesta expressió en la medul·la espinal es va veure més elevada en la regió lumbar i cervical que en la regió toràcica. Curiosament, d'una manera similar, el tronc cerebral i el cervell van mostrar també més expressió de luciferasa, en aquest cas, que el cerebel. En ambdós casos, això va ser degut al major tropisme cel·lular que té el AAV9 per aquestes regions (496,498,603–606).

Rellevantment, els teixits sistèmics també van demostrar expressió de luciferasa. De manera que tot i realitzar una administració intratecal en el líquid cefalorraquidi del sistema nerviós central, que està protegit per la barrera hematoencefàlica, aquest va ser capaç d'arribar i transduir òrgans perifèrics, com el fetge, el cor, el pàncreas, múscul esquelètic, els pulmons, els ronyons, el colon i la melsa, confirmant el que s'havia observat en estudis anteriors en ratolins (498,603,604), i altres models animals (466,473). Aquest mecanisme del vector AAV9 per creuar del SNC a la circulació perifèrica actualment no està del tot caracteritzat, però es creu que és degut a canals perivasculars i limfàtics del SNC que permeten el drenatge de partícules virals des del líquid cefalorraquidi al torrent sanguini (607–609). Per al tractament de l'atàxia de Friedreich aquesta transducció en teixits perifèrics obtinguda amb una administració intratecal és un benefici més del tractament, ja que la malaltia es caracteritza per ser multisistèmica, on la deficiència de frataxina es troba en totes les cèl·lules del cos, tot i no mostrar totes elles una patologia evident. Per tant, no és necessària una administració intrasistèmica per poder transduir teixits perifèrics, ja que l'administració intratecal permet la biodistribució dels rAAV9 per totes les cèl·lules de teixits sistèmics analitzats, inclosos el cor i el pàncrees, els quals si que es troben afectats en l'atàxia de Friedreich.

La forta senyal luminescent detectada en el tòrax dels ratolins administrats amb el vector rAAV9-LUC en l'assaig de bioluminescència *in vivo* provenia del fetge, emmascarant la detecció d'expressió de luciferasa en els altres teixits contigus. Aquesta forta expressió va ser deguda a l'elevat tropisme que tenen els diversos serotips AAV pel fetge, i conseqüentment també el serotip 9, inclús administrant-se intratecalment (498,603–605). Tot i això, aquesta elevada expressió de frataxina en el fetge no resulta tòxica, i és ben tolerada, ja que en un estudi recent es va demostrar que el fetge dels ratolins tolera fins a 90 vegades la quantitat endògena de frataxina sense mostrar hepatotoxicitat o altres alteracions patològiques (550). Per tant, donat que el fetge és un dels òrgans amb més expressió, però aquesta no s'aproxima als nivells de sobreexpressió que s'han descrit que causen toxicitat, indica que els nivells d'expressió de frataxina recombinant que s'obtenen en general amb el vector viral rAAV9-FXN administrat intratecalment, es troben dins d'un rang d'expressió segur i ben tolerat. Estudis inicials d'histologia en els nostres ratolins no

han demostrat increments en inflamació en el fetge dels ratolins administrats amb els vectors virals tant rAAV9-Null com rAAV9-FXN.

Increment dels nivells d'expressió d'ARNm de frataxina en teixits de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

L'estudi transcripcional va confirmar que el constructe d'expressió inclòs en el AAV9 era capaç de realitzar la transcripció de la seqüència d'ADN codificant de frataxina recombinant en les cèl·lules transduïdes, ja que es va detectar la presència d'ARNm de frataxina recombinant en tots els teixits analitzats. En conseqüència, l'administració intratecal del vector rAAV9-FXN va demostrar ser eficaç per incrementar en general els nivells totals d'ARNm de frataxina en tots els teixits analitzats, excepte el pàncreas, on no es va detectar expressió d'ARNm de frataxina recombinant. Això per una banda va suggerir la potencialitat terapèutica d'aquesta estratègia de teràpia gènica, i per l'altra va confirmar l'àmplia biodistribució del vector rAAV9-FXN, tant en teixits del sistema nerviós central i perifèric, com en teixits sistèmics, que ja s'havia observat en l'assaig de bioluminescència, seguint el mateix patró en quan a nivells d'expressió, i demostrant la reproductibilitat del tractament intratecal amb els vectors rAAV9 generats.

Els òrgans amb un increment més elevat de frataxina total van ser el fetge, tal com s'ha comentat prèviament, per l'elevat tropisme que tenen els AAV per aquest òrgan; i els DRG lumbar perquè es troben pròxims al lloc d'administració i perquè el AAV9 ha demostrat una elevada capacitat de transducció en teixits del SNP, degut al transport axonal característic i a l'elevat tropisme que tenen particularment per les neurones dels DRG (467,475,501,603). Ambdós teixits van mostrar nivells d'ARNm de frataxina semblants als nivells dels ratolins YG8R homozigots, els quals mostren un fenotip no patològic similar al que exhibeixen els ratolins WT (289), suggerint que el vector rAAV9-FXN administrat intratecalment pot proveir uns nivells de frataxina potencialment terapèutics en els ratolins YG8R.

Altres teixits que van demostrar un increment significatiu d'ARNm de frataxina van ser la medul·la espinal, concretament les seccions lumbar i cervical, i el còrtex frontal del cervell. La medul·la espinal toràctica, va ser la part de la medul·la espinal amb menys expressió d'ARNm de frataxina en comparació amb les seccions lumbar i cervical. El mateix va passar amb el cervell, en comparació amb el tronc cerebral i el còrtex frontal del cervell, tal com s'havia vist en l'assaig de bioluminescència. Malgrat això, aquests teixits juntament amb el cor també van mostrar un increment d'ARNm de frataxina respecte els nivells basals dels ratolins YG8R, que no van ser significatius degut principalment a la variabilitat que mostren els ratolins YG8R en els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina provinent del transgèn humà (192,200,287).

Àmplia biodistribució i expressió robusta i de llarga durada de la proteïna frataxina recombinant obtinguda en els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

L'administració intratecal del vector rAAV9-FXN en els ratolins YG8R a les 10 setmanes d'edat va demostrar ser eficient per expressar la proteïna frataxina recombinant àmpliament en els teixits del sistema nerviós central i perifèric, tal com es va observar en la medul·la espinal, els DRG a nivell lumbar, toràcic i cervical i els nervis perifèrics, en aquest cas el ciàtic. Aquesta biodistribució i tropisme van correlacionar amb els resultats obtinguts en els estudis transcripcionals i de bioluminescència. L'expressió de frataxina recombinant en els teixits del SNC i sobretot SNP és de vital importància per poder tractar l'atàxia de Friedreich, ja que és on es troben les cèl·lules que primer degeneren i que es veuen més severament afectades en la malaltia, causant els principals signes patològics que provoquen la pèrdua progressiva de l'autonomia dels pacients. Per tant, l'estratègia de teràpia gènica seguida en aquesta tesi va demostrar ser eficient per expressar frataxina en les cèl·lules diana principalment afectades i conseqüentment tenir potencial terapèutic per corregir la neurodegeneració en els ratolins YG8R.

La frataxina humana recombinant es va detectar en la seva forma madura en els teixits transduïts, demostrant que la forma precursora de frataxina que es sintetitza inicialment en les cèl·lules a partir del vector rAAV9-FXN, realitza el procés de maduració, és tallada per la peptidasa de processament mitocondrial dels ratolins en la regió N-terminal, i s'internalitza en la mitocòndria, tenint potencial per poder desenvolupar la seva funció, i així evitar l'afectació mitocondrial en les cèl·lules transduïdes dels diferents teixits dels ratolins YG8R (141,158,159). Aquesta localització mitocondrial es va confirmar per immunofluorescència amb microscòpia confocal.

Les imatges d'immunohistoquímica van demostrar l'eficiència de transducció i la capacitat d'expressió de frataxina del vector rAAV9-FXN en les neurones grans sensibles dels DRG. Els DRG lumbar van mostrar un percentatge més elevat de neurones transduïdes amb el vector rAAV9-FXN, i per tant més neurones que expressaven frataxina recombinant respecte als DRG toràcics i cervicals, seguint el mateix patró de biodistribució que s'havia vist en aquest mateix estudi en les diferents seccions de la medul·la espinal i tal com havien demostrat altres estudis amb una administració intratecal d'AAV en ratolins (498,603,605). També es va observar una intensitat d'expressió de frataxina més elevada en algunes neurones transduïdes que en d'altres. Això va ser degut a la variabilitat que mostren els AAV recombinants per expressar el transgèn en cada cèl·lula transduïda (462,498,512,603). Aquest estudi d'immunohistoquímica va servir per demostrar que la transducció d'entre el 10% fins al 60% de les neurones grans sensibles dels DRG, és suficient per prevenir la neurodegeneració característica a nivell cel·lular i molecular en aquest teixit, i conseqüentment la polineuropatia sensitiva en el model de ratolí YG8R. Per tant, això va suggerir que no és necessari transduir la totalitat de les neurones en els DRG per tenir un efecte terapèutic amb el vector de teràpia gènica rAAV9-FXN. Aquests resultats concorden amb

els que es van descriure en un estudi de teràpia gènica per a la FRDA amb un model de ratolí KO condicional deficient de frataxina en el cor, en el qual es va obtenir un efecte terapèutic amb la transducció aproximada del 30-40% de cardiomiòcits (368).

L'administració única intratecal del vector rAAV9-FXN en els ratolins YG8R va demostrar la capacitat d'expressar frataxina recombinant al llarg del temps en teixits sistèmics com el fetge i teixits del sistema nerviós central i perifèric com es va veure en la medul·la espinal i els DRG lumbar. Per tant, el promotor PGK juntament amb la resta d'elements reguladors inclosos en el constructe d'expressió dels rAAV9 van demostrar proveir una expressió duradora de frataxina en aquests teixits fins almenys 24 mesos d'edat, que equival pràcticament a tota la vida dels ratolins. Malgrat que els resultats obtinguts van ser únicament indicatius però no conclusius degut a que tan sols es va analitzar un ratolí a cada edat, es van veure diferències en el patró d'expressió de frataxina en el temps en els diferents teixits que es van analitzar. En el fetge l'expressió de frataxina es va mantenir robusta al llarg del temps des dels 3 fins als 24 mesos d'edat. Això correlaciona amb els resultats que s'han obtingut en un estudi de teràpia gènica amb AAV, on han demostrat expressió de proteïna transgènica en fetge d'humans durant més de 5 anys (610). En la medul·la espinal l'expressió de frataxina va seguir un patró decreixent, amb una expressió més elevada en els 3 mesos d'edat, robusta almenys fins als 14 mesos d'edat, i dràsticament disminuïda als 24 mesos d'edat. Aquesta disminució progressiva s'ha descrit que podria ser deguda a la regeneració i divisió de les cèl·lules transduïdes, que pot fer que es perdi el transgèn que conté la seqüència codificant de frataxina recombinant, ja que es troba en forma episomal en el nucli de les cèl·lules, tal com succeeix en altres tipus cel·lulars (611). En canvi, curiosament en els DRG es va observar la tendència contrària, inicialment les dos primeres setmanes després de l'administració no es va detectar expressió de frataxina, però va anar incrementant progressivament amb el temps fins als 14 mesos d'edat, i es va mantenir consistent fins almenys els 24 mesos d'edat del ratolí. Diversos estudis ja havien reportat un increment d'expressió progressiva de proteïna recombinant en el temps després de l'administració d'AAV en els DRG de ratolins. Concretament, han descrit una expressió nul·la o molt baixa tant de cèl·lules transduïdes com de nivells d'expressió de la proteïna terapèutica entre la primera i tercera setmana postinjecció, inclús amb administracions directes en el gangli, que progressivament incrementen amb el temps (498,612–614). Això s'ha atribuït al fet d'haver tingut més temps de síntesi de la proteïna recombinant, al tipus de promotor utilitzat per regular l'expressió de la proteïna terapèutica, i a l'increment de la biodistribució dels AAV pel SNC i SNP amb el temps, que permet la transducció de cèl·lules més distants al lloc d'administració degut al transport retrògrad i anterògrad característic dels AAV, i que té sobretot el AAV9 (498,612–614). Per tot això, l'administració única i intratecal del vector viral rAAV9-FXN va demostrar proveir una expressió duradora de frataxina recombinant en teixits del sistema nerviós central, perifèric i teixits

sistèmics de fins a 2 anys en els ratolins, de manera que aquesta estratègia pot suposar un tractament de per vida, sense la necessitat de realitzar readministracions.

Els nivells d'expressió de frataxina recombinant que es van obtenir en els DRG i la medul·la espinal lumbar de ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN als 14 mesos d'edat, van trobar-se dins d'un rang segur, no tòxic, ben tolerat, amb nivells similars als endògens de frataxina murina que expressen els ratolins WT, i per tant amb potencial terapèutic. Es van comparar amb els nivells de frataxina endògena dels ratolins WT perquè són els ratolins control, que exhibeixen un fenotip neurològic normal, i que equivalen als nivells que tindrien els individus no portadors en l'atàxia de Friedreich. Aquesta comparació no es va fer respecte els nivells de frataxina dels ratolins YG8R hemizigots degut a que en aquests teixits nerviosos, el ratolí YG8R té una expressió molt elevada del transgèn, i en conseqüència nivells més elevats de frataxina humana transgènica en comparació amb els nivells de frataxina murina endògena del ratolí WT (287), i que per tant, no es corresponen amb els nivells de frataxina que tenen els pacients amb FRDA. El motiu pel qual els ratolins YG8R tenen aquests nivells elevats de frataxina humana i manifesten igualment neurodegeneració i afectació en les cèl·lules d'aquests teixits no s'ha caracteritzat, però s'ha proposat que pot ser pel diferent perfil d'expressió del transgèn humà en cada tipus cel·lular (287), o també a causa d'una funció ineficient de la frataxina humana del transgèn en les cèl·lules de ratolí. El que si s'ha descrit és que els ratolins YG8R que són homozigots pel transgèn, tenen aproximadament el doble de quantitat de frataxina que els ratolins YG8R hemizigots utilitzats en aquest estudi, tal com es va demostrar en la quantificació dels nivells d'ARNm de frataxina total, i mostren un fenotip i funció mitocondrial més similar al ratolí WT de manera que es troben menys afectes que el ratolí YG8R hemizigot (200,288). Per tant, l'increment de frataxina en les cèl·lules dels DRG i la medul·la espinal degut al tractament de teràpia gènica amb el vector rAAV9-FXN té potencial per millorar el fenotip i la patologia en els ratolins YG8R hemizigots.

En els DRG lumbar, els nivells d'expressió de frataxina recombinant obtinguts van ser 1,76 vegades més elevats respecte els nivells endògens, mentre que en la medul·la espinal lumbar es va expressar 0,43 vegades respecte els nivells endògens dels ratolins WT, als 14 mesos d'edat. Aquests nivells inferiors en la medul·la espinal lumbar van ser deguts a que el vector AAV9 ha demostrat que no transdueix el total de cèl·lules en la medul·la espinal (498,603,604), i en aquest cas, s'estan comparant amb els valors de frataxina endògens que expressen totes les cèl·lules que hi ha en aquest teixit. Tot i això, en ambdós teixits es va aconseguir expressar uns nivells de frataxina recombinant per sobre dels nivells que necessiten les cèl·lules de pacients amb atàxia de Friedreich per arribar a expressar uns nivells de frataxina no patològics com els que tenen els individus portadors, els quals s'havien establert de 0,11 vegades superiors en cèl·lules fibroblasts. Per tant, l'administració única intratecal del vector rAAV9-FXN proveeix una expressió de

frataxina en els DRG i la medul·la espinal dins d'un rang potencialment terapèutic per tractar els ratolins YG8R i a més té potencial per incrementar els nivells de frataxina que exhibeixen els pacients, a uns nivells no patològics per sobre dels nivells dels individus portadors, i inclús igual o per sobre dels nivells que mostren els individus no portadors.

L'expressió suprafisiològica de frataxina recombinant obtinguda en els DRG dels ratolins YG8R, tot i ser 1,76 vegades més elevada que els nivells de frataxina endògena murina, va demostrar ser segura i ben tolerada, ja que tal com s'ha descrit en nombrosos models experimentals de llevat, drosòfila, línies cel·lulars humanes i ratolins, la sobreexpressió de frataxina és tòxica per les cèl·lules en uns nivells a partir d'entre 6 i 10 vegades per sobre dels endògens (185,218,268,269,550–552), i ben tolerada per sota d'aquests (19,267,279,553,554). Per tant, aquesta sobreexpressió de frataxina recombinant en els DRG dels ratolins administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN no va suposar un problema de toxicitat cel·lular, més aviat el contrari, juntament amb l'expressió de frataxina en la medul·la espinal, va demostrar eficàcia terapèutica per prevenir la neurodegeneració de les neurones grans sensibles dels DRG i la pèrdua de les neurones grans del nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal, tal com es va veure en els estudis d'histologia. Aquesta prevenció a nivell cel·lular es va traduir conseqüentment amb una millora fenotípica sensoriomotora.

En definitiva, el tractament de teràpia gènica amb el vector rAAV9-FXN administrat única i intratecalment en el líquid cefalorraquidi en ratolins YG8R de 10 setmanes d'edat va demostrar ser eficaç per expressar la proteïna frataxina àmpliament en cèl·lules de teixits del sistema nerviós central i perifèric i teixits sistèmics, de manera prolongada en el temps durant pràcticament tota la vida del ratolí, i en uns nivells en un rang fisiològic, segur, ben tolerat, no tòxic i potencialment terapèutic per ratolins i amb escalabilitat per als pacients amb atàxia de Friedreich.

Prevenció de l'afectació fenotípica sensoriomotora dels ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

Els model de ratolí YG8R va demostrar en general una afectació fenotípica sensoriomotora progressiva des dels 4 mesos d'edat, en els 4 tests en que es van avaluar en comparació amb els ratolins control WT, amb unes característiques patològiques molt similars a les que presenten els pacients amb atàxia de Friedreich. El tractament de teràpia gènica amb el vector viral rAAV9-FXN administrat intratecalment en els ratolins YG8R a les 10 setmanes d'edat va demostrar ser eficient per prevenir en general aquesta afectació fenotípica motora i sensitiva característica de l'atàxia de Friedreich fins almenys els 14 mesos d'edat dels ratolins, és a dir, 1 any després de l'administració. Els ratolins que van rebre el tractament van mostrar un patró similar als ratolins control WT, pràcticament en totes les característiques avaluades en els tests de comportament,

excepte el pes, i per tant significativament diferents als ratolins YG8R administrats amb el vector buit rAAV9-Null.

Els estudis d'electrofisiologia en el nervi caudal de la cua dels ratolins YG8R van servir per determinar una neuropatologia sensitiva identificada a partir dels 4 mesos d'edat i agreujada gradualment en el temps fins als 13 mesos d'edat, que es caracteritzava per la disminució de l'amplitud dels potencials d'acció sensitius del nervi caudal perifèric, suggerint una neurodegeneració progressiva dels nervis sensitius perifèrics, tal com succeeix en els pacients amb FRDA (47,615,616). Aquesta neuropatia s'ha identificat recentment en aquest model en un estudi als 9 mesos d'edat (288), mentre que anteriorment tan sols s'havia observat una tendència a la reducció dels potencials d'acció sensitius (192). Per tant, en aquesta tesi s'ha demostrat que el model YG8R pateix una neuropatia sensitiva a una edat encara més precoç que la que s'havia descrit fins ara. L'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN en els ratolins YG8R realitzada a les 10 setmanes d'edat, va demostrar la prevenció d'aquesta polineuropatia sensitiva, mostrant una amplitud dels potencials d'acció sensitius del nervi caudal de la cua similar als dels ratolins WT al llarg del temps, amb una tendència a l'alça, inclús superiors a aquests ratolins control, tot i que no de manera significativa, indicant el manteniment del número d'axons, la seva morfologia, evitant la desmielinització i en definitiva la neurodegeneració del nervi perifèric caudal de la cua. Això va suggerir que l'increment de frataxina en els nervis perifèrics degut al tractament amb rAAV9-FXN, el qual s'havia vist en aquest estudi concretament en el nervi ciàtic, era capaç de prevenir la polineuropatia en el model de ratolí YG8R. Les imatges obtingudes per microscòpia electrònica de transmissió de nervis perifèrics, en aquest cas, de les arrels dorsals dels DRG de ratolins administrats intratecalment amb rAAV9-FXN, van demostrar la prevenció de la neurodegeneració dels axons, establint una correlació terapèutica a nivell fenotípic i a nivell cel·lular del tractament de teràpia gènica en els ratolins YG8R.

En el test del rotarod accelerat, el ratolí YG8R va mostrar uns valors de temps de latència en roda molt baixos i constants al llarg del temps en comparació amb els ratolins control WT, evidenciant problemes de coordinació motora de manera significativa des dels 4 mesos d'edat, determinada sobretot per la incapacitat d'aprenentatge motor (192,287,289). L'administració intratecal del tractament en els ratolins YG8R a les 10 setmanes d'edat va demostrar prevenir aquests defectes de coordinació motora, mostrant un patró gairebé idèntic als ratolins WT al llarg del temps. Tant els ratolins control WT com els YG8R administrats amb rAAV9-FXN, a diferència dels ratolins YG8R administrats amb el vector buit, van mostrar inicialment un increment de la capacitat motora entre els 3 i 6 mesos d'edat, seguit per una disminució progressiva, a partir dels 8 mesos d'edat, la qual es va atribuir al factor biològic de l'envelliment, comú en tots els animals (617). Tot i això, aquest descens va ser més pronunciat en els ratolins YG8R administrats amb rAAV9-FXN que en els ratolins control WT, igualant als 12-14 mesos d'edat als ratolins YG8R amb el

vector rAAV9-Null. Es va descartar que aquest fet fos degut a una disminució de l'efecte del tractament ja que es va demostrar expressió de frataxina recombinant robusta als 14 mesos d'edat en tots els teixits i ratolins avaluats. A més, en la resta de tests no es va observar aquest descens de l'efecte, de fet, en l'anàlisi de l'electrofisiologia inclús es van obtenir valors més elevats d'amplitud del potencial d'acció sensitiu als 14 mesos d'edat respecte el WT. Per tant, la causa probablement va ser deguda a l'increment de pes que es va detectar en els ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN respecte el WT, i que limita la capacitat motora del ratolí en la roda (618,619).

El reflex d'agafada o *clasping*, que no s'havia avaluat mai prèviament en aquest model animal YG8R, va resultar patològicament alterat des dels 4 mesos d'edat, amb tendència a augmentar al llarg del temps, indicant una neurodegeneració de la via corticoespinal del sistema nerviós tal com mostra un model de FRDA que és KO condicional deficient de frataxina en múscul (620), i altres models de ratolí de malalties neurodegeneratives com atàxies espinocerebel·loses amb afectació similar a l'atàxia de Friedreich (580,621,622). Interessantment, als 2 mesos d'edat, previ a la injecció intratecal, els ratolins YG8R no van mostrar aquesta afectació, aportant una evidència més, de que aquest model no mostra patologia en el moment de l'administració dels vectors virals rAAV9 generats i per tant mantenen la capacitat de biodistribució intacta. Els ratolins YG8R que es van tractar amb el vector rAAV9-FXN, tot i no mostrar els mateixos valors que els ratolins control WT, no van assolir els valors patològics que mostraven els ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-Null en cap de les edats analitzades, mantenint-los estables i estadísticament diferents a aquests al llarg del temps. De manera que el tractament de teràpia gènica amb el vector rAAV9-FXN va demostrar prevenir la neurodegeneració del tracte corticoespinal del sistema nerviós com a mínim fins als 14 mesos d'edat en els ratolins YG8R.

En l'anàlisi de la marxa amb el registre de les petjades, l'administració del tractament de teràpia gènica amb el vector rAAV9-FXN en els ratolins YG8R va demostrar ser eficaç per prevenir l'alteració de la marxa, i en conseqüència evitar els problemes propioceptius que s'ha vist que presenta aquest model de ratolí als 12 mesos d'edat, que es caracteritzen per un increment de la distància de solapament de les potes anteriors i posteriors entre les passes, que es tradueix en un perfil de la marxa irregular i patològic.

L'índex fenotípic calculat de manera homòloga a les escales quantitatives ICARS, FARS i SARA que s'utilitzen per monitoritzar la progressió de la malaltia i avaluar tractaments en assajos clínics en pacients amb FRDA, va servir per conèixer l'estat fenotípic sensoriomotor de cadascun dels ratolins analitzats, de manera quantitativa, tenint en compte els resultats obtinguts dels 4 tests de comportament avaluats. A part, l'anàlisi conjunt dels ratolins de cada grup, de les característiques patològiques referents a la coordinació motora, polineuropatia sensitiva, neurodegeneració del tracte corticoespinal i la propiocepció, va confirmar la patologia fenotípica sensoriomotora del

model de ratolí YG8R, i va demostrar l'eficàcia del tractament rAAV9-FXN administrat intratecalment per prevenir totes les característiques fenotípiques patològiques analitzades en els ratolins YG8R.

Prevenició de la neuropatologia i la cardiomiopatia en els ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

El conjunt de la neuropatologia del ratolí YG8R avaluada en aquest estudi va evidenciar una afectació més severa en els nervis perifèrics i els DRG del SNP, seguit per la medul·la espinal i finalment el cerebel del SNC, en forma ascendent seguint el tracte sensitiu tal com manifesten els pacients amb FRDA (192,287–289). La capacitat demostrada del vector rAAV9-FXN en els estudis de biodistribució i tropisme per arribar, transduir i expressar frataxina particularment en els teixits del SNP, que són els que primer degeneren i més severament tant en el model de ratolí YG8R com en els pacients amb atàxia de Friedreich, justifiquen l'estratègia desenvolupada en aquesta tesi en l'ús del serotip AAV9 i l'administració directament en el líquid cefalorraquidi mitjançant una injecció intratecal en la zona lumbar de la columna vertebral. Aquest tractament de teràpia gènica va demostrar prevenir la neurodegeneració i cardiomiopatia a nivell cel·lular característiques de la FRDA en aquest model de ratolí fins almenys els 14 mesos d'edat.

En els DRG de ratolins YG8R es va identificar una neurodegeneració de les neurones grans sensibles caracteritzada per la presència de picnosis i vacuolització. Aquestes característiques indiquen que les neurones grans sensibles han iniciat un procés de degeneració i mort cel·lular a través de necrosi o apoptosi tal com s'ha vist que succeeix en diversos desordres neurodegeneratius (623–625). L'administració intratecal del vector rAAV9-FXN va demostrar prevenir l'aparició de picnosi i la vacuolització en les neurones grans sensibles dels DRG. De manera que l'increment dels nivells de frataxina que s'han demostrat en aquest estudi degut al tractament de teràpia gènica, eviten el procés de neurodegeneració cel·lular en aquest teixit en els ratolins YG8R fins almenys els 14 mesos d'edat.

En la medul·la espinal lumbar dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat, la neurodegeneració es va determinar per la pèrdua de densitat neuronal, sobretot de neurones grans, en el nucli dorsal de la columna posterior, coincidint amb la neurodegeneració que manifesten els pacients amb FRDA (34). L'administració intratecal amb el vector viral rAAV9-FXN va demostrar ser eficient per prevenir la neurodegeneració en aquesta regió de la medul·la espinal. De manera que l'increment de frataxina degut al tractament de teràpia gènica evita la pèrdua de les neurones grans sensibles en el nucli dorsal de la columna posterior de la medul·la espinal, les quals reben els axons dels DRG i envien la informació sensitiva i propioceptiva inconscient al cerebel (34), correlacionant amb la prevenició propioceptiva que s'havia observat en l'anàlisi de la marxa dels ratolins YG8R administrats amb el vector rAAV9-FXN, i en el conjunt de l'afectació fenotípica sensitiva.

En el cerebel, l'administració intratecal del tractament de teràpia gènica amb el vector viral rAAV9-FXN va prevenir l'aparició de la neurodegeneració i l'inici de mort cel·lular per apoptosi de les neurones grans del nucli dentat cerebel·lós dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat. Aquesta neurodegeneració va consistir concretament amb l'aparició de cromatòlisi en les neurones grans del nucli dentat, ja que mostraven una pèrdua de tinció que indicava la disgregació dels cossos de Nissl, i a més presentaven un lleuger increment de la seva mida. Aquestes característiques neuropatològiques van suggerir un inici de neurodegeneració precursora de mort neuronal per apoptosi de les cèl·lules grans del nucli dentat cerebel·lós dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat (272,626–630). La neurodegeneració que es descriu en aquesta tesi en el cerebel dels ratolins YG8R és diferent a la que s'ha descrit que presenten els pacients amb FRDA, els quals manifesten sobretot una pèrdua de les neurones grans glutamatèrgiques del nucli dentat (34). La neurodegeneració en el cerebel dels pacients amb FRDA apareix en un estadi ja avançat de la malaltia, la qual cosa justifica que en els ratolins YG8R pugui ser inexistent abans dels 14 mesos d'edat (289), i sigui lleu a aquesta edat, ja que no s'arriben a perdre les neurones grans del cerebel, degut a la progressió lenta i severitat moderada de la malaltia que s'ha descrit que presenta en general el model YG8R (192,289). En definitiva, el tractament amb el vector rAAV9-FXN va demostrar ser eficaç per prevenir l'aparició de la cromatòlisi i l'increment de la mida de les neurones grans del nucli dentat cerebel·lós, i per tant, va evitar la neurodegeneració que s'havia identificat en el cerebel dels ratolins YG8R fins als 14 mesos d'edat.

En nervis perifèrics com els de les arrels dorsals de ratolins YG8R de 14 mesos d'edat, la neurodegeneració es va caracteritzar en aquest estudi mitjançant microscòpia electrònica de transmissió, per una disminució de la mida dels axons i la pèrdua de la mielina que els cobreix. En comparació amb el que succeeix en els nervis perifèrics dels pacients amb FRDA, els ratolins YG8R no van evidenciar una disminució del número total d'axons, ni tan sols la pèrdua dels axons grans, però sí que es va identificar la disminució en la mida dels axons i la desmielinització que també exhibeixen de manera similar els pacients amb FRDA (44–49), indicant que tenen el mateix tipus de neurodegeneració degut a la pèrdua de frataxina, però amb menys severitat almenys als 14 mesos d'edat. El tractament de teràpia gènica amb el vector rAAV9-FXN va demostrar ser eficaç per prevenir la neurodegeneració identificada en les arrels dorsals dels ratolins YG8R, evitant l'atròfia axonal i la desmielinització almenys fins als 14 mesos d'edat. Aquesta prevenció de la neurodegeneració a nivell cel·lular dels nervis perifèrics, en aquest cas, de les arrels dorsals, va correlacionar amb els resultats obtinguts en l'avaluació de la polineuropatia sensitiva en els estudis de conducció nerviosa realitzats per electrofisiologia del nervi caudal de la cua, tot i no analitzar-se directament el mateix nervi perifèric, per la indisponibilitat anatòmica que tenen els nervis de les arrels dorsals. De manera que l'increment d'expressió de frataxina en el general dels nervis perifèrics, tal com es va veure per exemple en el nervi ciàtic, degut a l'administració

intratecal de rAAV9-FXN, va demostrar mantenir la mida dels axons i la quantitat de mielina, correlacionant amb el manteniment de l'amplitud del potencial d'acció sensitiu del nervi perifèric caudal als 14 mesos d'edat, tal com es va veure en l'estudi d'electrofisiologia.

Interessantment, en l'interior dels axons de les arrels dorsals dels ratolins YG8R es van observar mitocòndries amb una morfologia anormal, caracteritzades per un engrandiment de la mida, la matriu mitocondrial buida i les crestes disgregades i acumulades en els pols de la mitocòndria. Aquesta morfologia mitocondrial anormal presentava les mateixes característiques a les que s'havien identificat en aquesta tesi en les cèl·lules fibroblasts de pacients amb FRDA en l'anàlisi tridimensional per criomicroscòpia tomogràfica de raigs X en el sincrotró ALBA. Això va suggerir que la deficiència de frataxina causa una morfologia mitocondrial patològica comuna en diferents tipus cel·lulars tant d'humans com de ratolí. Les arrels dorsals dels ratolins tractats intratecalment amb el vector viral rAAV9-FXN no van mostrar aquestes mitocòndries morfològicament anormals, sinó que van demostrar mantenir les crestes i una matriu densa. De manera que l'increment de frataxina que proveeix el tractament, prevé la pèrdua estructural i morfològica de les mitocòndries en els axons de les arrels dorsals dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat, indicant una millora terapèutica de la neurodegeneració a nivell cel·lular en aquest teixit.

En aquest estudi es va determinar una cardiomiopatia en el model de ratolí YG8R als 14 mesos d'edat caracteritzada per un engrossiment significatiu de la paret del ventricle esquerra i l'acumulació de dipòsits de ferro en la paret del ventricle esquerra. Comparativament aquestes característiques patològiques són similars a les que es manifesten en alguns pacients amb FRDA en estadis inicials de la cardiomiopatia, ja que aquests presenten un engrossiment de les parets del ventricle esquerra, degut a la hipertròfia dels cardiomiòcits i l'acumulació de dipòsits de ferro (8,10,34,57,61). En canvi, les característiques patològiques que es mostren en el cor dels pacients en un estadi més avançat de la malaltia, com l'increment del volum del ventricle esquerra, la fibrosi i la mort dels cardiomiòcits que impedeixen el correcte bombeig de la sang, no es van identificar en el cor dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat. Per tant, donat que en aquest estudi únicament s'han identificat les característiques patològiques inicials de la cardiomiopatia que tenen els pacients, als 14 mesos d'edat dels ratolins, la qual és una edat avançada; sumat al fet que a diferència dels pacients, el model de ratolí YG8R té una esperança de vida normal, i per tant, no presenta mort prematura degut a la cardiomiopatia (192), indica que aquesta patologia cardíaca tot i estar present en els ratolins YG8R, no és molt severa, la qual cosa explica la tendència a l'engrossiment no significativa de la paret del septe interventricular. Addicionalment, en aquest estudi es va demostrar l'acumulació de dipòsits de ferro en el cor dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat, una edat més prematura a la que s'havia descrit fins ara en aquest model de ratolí, identificada tan sols en un estudi, als 18 mesos d'edat (631).

L'administració intratecal del vector rAAV9-FXN en els ratolins YG8R va demostrar la capacitat de transducció sistèmica i expressió de frataxina en el cor, tal com es va veure en l'assaig de bioluminescència i la quantificació d'ARNm de frataxina recombinant. Això va fer que aquesta estratègia de teràpia gènica fos capaç de prevenir la cardiomiopatia, evitant l'increment del gruix de la paret del ventricle esquerra i reduint l'acumulació de dipòsits de ferro en el teixit cardíac dels ratolins YG8R almenys fins als 14 mesos d'edat. Aquests efectes terapèutics suggereixen que l'increment de frataxina en el cor redueix l'acumulació de ferro i per tant promou la formació dels centres Fe-S en els cardiomiòcits del ventricle esquerra.

Per tant, l'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN realitzada en els ratolins YG8R a les 10 setmanes d'edat va demostrar eficàcia terapèutica per prevenir la neuropatologia i cardiomiopatia característiques de l'atàxia de Friedreich almenys fins als 14 mesos d'edat en aquest model de ratolí.

Prevenició de la disfunció mitocondrial del ratolins YG8R administrats intratecalment amb el vector rAAV9-FXN.

La patologia molecular identificada en aquest estudi es va caracteritzar per la disminució de l'activitat dels complexos I i II de la cadena transportadora d'electrons (ETC) en els DRG dels ratolins YG8R als 14 mesos d'edat. En aquest cas, el tractament amb el vector viral rAAV9-FXN va prevenir significativament la disminució de l'activitat del complex I de la ETC, i també, tot i que no de manera significativa, va demostrar una tendència per mantenir l'activitat del complex II en els DRG lumbar dels ratolins YG8R fins als 14 mesos d'edat. Aquest efecte terapèutic en l'activitat dels complexos I i II de la ETC va suggerir que l'increment dels nivells de frataxina proporcionats pel vector rAAV9-FXN en els DRG, promou la formació de centres Fe-S en la mitocondria, necessaris per a que les proteïnes que formen els complexos I i II de la ETC desenvolupin la seva activitat, contribuint a la millora funcional de la mitocondria, tal com s'ha descrit que succeeix quan s'incrementa els nivells de frataxina, en models cel·lulars *in vitro* que en són deficitaris (19,233).

CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi doctoral són les següents:

1. La regulació del gen *FXN* és complexa tal com es prova que s'hagi identificat 20 possibles llocs nous d'unió per a 10 factors de transcripció diferents, anteriorment no descrits, entre la regió promotora de 5 kb i l'intró 1 del gen *FXN*; i 95 possibles noves dianes d'unió d'ARNmi localitzades majoritàriament en els primers 400 pb de la regió 3'UTR del gen.
2. S'ha determinat que és necessari augmentar entre 22-25% els nivells d'expressió d'ARNm de frataxina, i incrementar com a mínim un 11% els nivells d'expressió de proteïna frataxina en les cèl·lules dels pacients amb FRDA per arribar als nivells d'expressió no patològics que presenten les cèl·lules en els individus portadors asimptomàtics, i així, tenir un efecte potencialment terapèutic que permeti tractar a nivell molecular, cel·lular i fenotípic l'atàxia de Friedreich.
3. L'estudi amb criomicroscòpia tomogràfica de raigs X, aplicada per primera vegada a l'atàxia de Friedreich, va demostrar que les cèl·lules fibroblasts dels pacients amb FRDA presenten un increment significatiu de mitocondries amb una alteració morfològica que es caracteritza per un engrandiment de la mida, de pràcticament el doble del volum, juntament amb la disrupció de les crestes i la membrana interna mitocondrials, les quals s'acumulen en els pols de la mitocondria, deixant la matriu buida, i obtenint conseqüentment una morfologia mitocondrial anormal, disfuncional i patològica.
4. El vector recombinant que conté la seqüència de l'ADN codificant de la isoforma 1 canònica de la frataxina, juntament amb els elements reguladors del promotor humà de la fosfoglicerat quinasa 1 (PGK), la seqüència Kozak, l'element regulador posttranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota americana (WPRE) i la senyal de poliadenilació de la hormona de creixement bovina (bGH PA) va demostrar ser eficient per expressar la proteïna frataxina en cèl·lules humanes i de ratolí, en uns nivells dins d'un rang fisiològic segur, no tòxic, similar als endògens no patològics i per tant amb potencial terapèutic.
5. Una única administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN en el model de ratolí YG8R a les 10 setmanes d'edat ha demostrat una àmplia biodistribució i capacitat de transducció cel·lular en teixits del sistema nerviós perifèric i central, així com en teixits sistèmics, proporcionant una expressió de frataxina recombinant de llarga durada fins almenys 22 mesos després de l'administració, i en uns nivells dins d'un rang fisiològic segur, no tòxic i potencialment terapèutics per incrementar els nivells endògens deficients de frataxina a uns nivells no patològics.
6. L'administració única i intratecal del vector viral rAAV9-FXN ha demostrat prevenir la polineuropatia sensitiva, mantenir el reflex d'agafada i evitar l'afectació de la coordinació

motora, de la marxa i de la propiocepció en el model de ratolí YG8R amb atàxia de Friedreich almenys fins als 14 mesos d'edat.

7. L'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN ha demostrat prevenir la neuropatologia característica de l'atàxia de Friedreich en el model de ratolí YG8R, evitant la neurodegeneració cel·lular en els DRG, en el nucli dorsal de les columnes posteriors de la medulla espinal, en el nucli dentat del cerebel i en nervis perifèrics com els de les arrels dorsals fins almenys 12 mesos després de l'administració del tractament.
8. L'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN ha demostrat prevenir la cardiomiopatia característica de l'atàxia de Friedreich, evitant l'engrossiment de les parets ventriculars del cor i reduint l'acumulació de dipòsits de ferro en els cardiomiòcits dels ratolins YG8R almenys fins als 14 mesos d'edat.
9. L'administració intratecal del vector viral rAAV9-FXN va prevenir la disfunció mitocondrial en els DRG dels ratolins YG8R fins als 14 mesos d'edat.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren l'eficàcia terapèutica a llarg termini de l'administració única intratecal del vector viral rAAV9-FXN per prevenir, aturar i tractar a nivell preclínic els signes fenotípics, cel·lulars i moleculars característics de l'atàxia de Friedreich en un model de ratolí de la malaltia. Aquests resultats proporcionen una nova prova de concepte i justifiquen la potencialitat terapèutica d'aquesta estratègia de teràpia gènica basada amb el vector rAAV9-FXN generat per al tractament dels pacients amb atàxia de Friedreich.

A conseqüència dels resultats exitosos obtinguts en aquest estudi i que s'han exposat en aquest treball es va sol·licitar una patent internacional (WO2019076973A1) i obtenir un informe de patentabilitat positiu per la oficina europea de patents (EPO), actualment sotmesa en fases nacionals a Austràlia, Canadà, Corea del Sud, Estats Units, Japó, Regne Unit, Unió Europea, i Xina, per tal de protegir aquesta nova estratègia de teràpia gènica. A més, es va establir l'*spin-off* Biointaxis S.L. al 2018, a la que es va llicenciar la tecnologia amb l'objectiu de desenvolupar i implementar aquest tractament de teràpia gènica en assajos clínics en pacients amb l'atàxia de Friedreich.

BIBLIOGRAFIA

1. Friedreich N. Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med*, 26, 391–419 (1863).
2. Friedreich N. Ueber Ataxie mit besonderer Berücksichtigung der hereditären Formen. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med*, 68, 145–245 (1876).
3. Friedreich N. Paramyoklonus multiplex. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med*, 86, 421–430 (1881).
4. Greenfield JG, Aring CD. The Spino-Cerebellar Degenerations. (Edited by Charles D. Aring). *Blackwell Scientific Publications*, Oxford (1954).
5. Pearce JMS. Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 688–688 (2004).
6. Bürk K. Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum & Ataxias*, 4, 4 (2017).
7. Mott FW. Case of Friedreich's disease, with autopsy and systematic microscopical examination of the nervous system. *Arch Neurol Psychiat Lond* (1907).
8. Lamarche JB, Côté M, Lemieux B. The Cardiomyopathy of Friedreich's Ataxia Morphological Observations in 3 Cases. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*, 7, 389–396 (1980).
9. Geoffroy G, Barbeau A, Breton G, et al. Clinical Description and Roentgenologic Evaluation of Patients with Friedreich's Ataxia. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*, 3, 279–286 (1976).
10. Harding AE. Friedreich's ataxia: A clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, 104, 589–620 (1981).
11. Harding AE, Zilkha KJ. "Pseudo-dominant" inheritance in Friedreich's ataxia. *J Med Genet*, 18, 285–287 (1981).
12. Chamberlain S, Shaw J, Rowland A, et al. Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature*, 334, 248–250 (1988).
13. Fujita R, Agid Y, Trouillas P, et al. Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics*, 4, 110–111 (1989).
14. Chamberlain S, Farrall M, Shaw J, et al. Genetic recombination events which position the Friedreich ataxia locus proximal to the D9S15/D9S5 linkage group on chromosome 9q. *Am J Hum Genet*, 52, 99–109 (1993).
15. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271, 1423–1427 (1996).
16. Rötig A, de Lonlay P, Chretien D, et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, 17, 215–217 (1997).
17. Mühlhoff U, Richhardt N, Ristow M, et al. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet*, 11, 2025–2036 (2002).
18. González-Cabo P, Vázquez-Manrique RP, García-Gimeno MA, et al. Frataxin interacts

- functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet*, 14, 2091–2098 (2005).
19. Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, et al. Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12239–12243 (2000).
 20. O’Neill HA, Gakh O, Park S, et al. Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry*, 44, 537–545 (2005).
 21. Gakh O, Park S, Liu G, et al. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet*, 15, 467–479 (2006).
 22. Zhang S, Napierala M, Napierala JS. Therapeutic Prospects for Friedreich’s Ataxia. *Trends Pharmacol Sci*, 40, 229–233 (2019).
 23. Anheim M, Fleury M, Monga B, et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: Implications for clinical management. *Neurogenetics*, 11, 1–12 (2010).
 24. Polo JM, Calleja J, Combarros O, et al. Hereditary ataxias and paraplegias in cantabria, Spain: An epidemiological and clinical study. *Brain*, 114, 855–866 (1991).
 25. Vankan P. Prevalence gradients of Friedreich’s Ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J Neurochem*, 126, 11–20 (2013).
 26. Labuda M, Labuda D, Miranda C, et al. Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology*, 54, 2322–2324 (2000).
 27. Dürr A, Cossee M, Agid Y, et al. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich’s ataxia. *N Engl J Med*, 335, 1169–1175 (1996).
 28. Pandolfo M. Friedreich ataxia: The clinical picture. *J Neurol*, 256, 3–8 (2009).
 29. Reetz K, Dogan I, Hohenfeld C, et al. Nonataxia symptoms in Friedreich Ataxia. *Neurology*, 91, e917–e930 (2018).
 30. Reetz K, Dogan I, Hohenfeld C, et al. Nonataxia symptoms in Friedreich Ataxia: Report from the Registry of the European Friedreich’s Ataxia Consortium for Translational Studies (EFACTS). *Neurology*, 91, e917–e930 (2018).
 31. Schols L. Friedreich’s ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics. *Brain*, 120, 2131–2140 (1997).
 32. Cnop M, Igoillo-Esteve M, Rai M, et al. Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Ann Neurol*, 72, 971–982 (2012).
 33. Cnop M, Mulder H, Igoillo-Esteve M. Diabetes in Friedreich Ataxia. *J Neurochem*, 126, 94–102 (2013).
 34. Koeppen AH. Friedreich’s ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J Neurol Sci*,

- 303, 1–12 (2011).
35. Tsou AY, Paulsen EK, Lagedrost SJ, et al. Mortality in Friedreich Ataxia. *J Neurol Sci*, 307, 46–49 (2011).
 36. De Michele G, Perrone F, Filla A, et al. Age of onset, sex, and cardiomyopathy as predictors of disability and survival in Friedreich's disease: A retrospective study on 119 patients. *Neurology*, 47, 1260–1264 (1996).
 37. Santos R, Lefevre S, Sliwa D, et al. Friedreich Ataxia: Molecular Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 13, 651–690 (2010).
 38. De Michele G, Filla A, Cavalcanti F, et al. Late onset Friedreich's disease: Clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57, 977–979 (1994).
 39. McCabe DJH, Ryan F, Moore DP, et al. Typical Friedreich's ataxia without GAA expansions and GAA expansions without typical Friedreich's ataxia. *J Neurol*, 247, 346–355 (2000).
 40. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Arch Neurol*, 65, 1296–303 (2008).
 41. Koeppen AH, Mazurkiewicz JE. Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72, 78–90 (2013).
 42. Oppenheimer DR. Brain Lesions in Friedreich's Ataxia. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*, 6, 173–176 (1979).
 43. Lamarche JB, Lemieux B, Lieu HB. The neuropathology of "typical" Friedreich's ataxia in Quebec. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*, 11, 592–600 (1984).
 44. Hughes JT, Brownell B, Hewer RL. The peripheral sensory pathway in friedreich's ataxia: An examination by light and electron microscopy of the posterior nerve roots, posterior root ganglia, and peripheral sensory nerves in cases of friedreich's ataxia. *Brain*, 91, 803–818 (1968).
 45. Rizzuto N, Monaco S, Moretto G, et al. Friedreich's Ataxia. A Light- and Electron Microscopic Study of Peripheral Nerve Biopsies. *Acta neuropathologica. Supplementum*, Vol. 7, pp. 344–347 (1981).
 46. Said G, Marion MH, Selva J, et al. Hypotrophic and dying-back nerve fibers in friedreich's ataxia. *Neurology*, 36, 1292–1299 (1986).
 47. Zouari M, Feki M, Ben Hamida C, et al. Electrophysiological and nerve biopsy: comparative study in Friedreich's ataxia and Friedreich's ataxia phenotype with vitamin E deficiency. *Neuromuscul Disord*, 8, 416–425 (1998).
 48. Lu C, Schoenfeld R, Shan Y, et al. Frataxin deficiency induces Schwann cell inflammation and death. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1792, 1052–1061 (2009).
 49. Koeppen AH, Morral JA, Davis AN, et al. The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol*, 118, 763–776 (2009).
 50. Lamarche J, Luneau C, Lemieux B. Ultrastructural Observations on Spinal Ganglion Biopsy in

- Friedreich's Ataxia: A Preliminary Report. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*, 9, 137–139 (1982).
51. Mascalchi M, Salvi F, Piacentini S, et al. Friedreich's ataxia: MR findings involving the cervical portion of the spinal cord. *Am J Roentgenol*, 163, 187–191 (1994).
 52. Koeppen AH, Michael SC, Knutson MD, et al. The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: The role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol*, 114, 163–173 (2007).
 53. Sanchez-Casis G, Cote M, Barbeau A. Pathology of the Heart in Friedreich's Ataxia: Review of the Literature and Report of One Case. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*, 3, 349–354 (1976).
 54. Alboliras ET, Shub C, Gomez MR, et al. Spectrum of cardiac involvement in Friedreich's ataxia: Clinical, electrocardiographic and echocardiographic observations. *Am J Cardiol*, 58, 518–524 (1986).
 55. Bourke T, Keane D. Friedreich's Ataxia: a review from a cardiology perspective. *Ir J Med Sci*, 180, 799–805 (2011).
 56. Schadt KA, Friedman LS, Regner SR, et al. Cross-Sectional Analysis of Electrocardiograms in a Large Heterogeneous Cohort of Friedreich Ataxia Subjects. *J Child Neurol*, 27, 1187–1192 (2012).
 57. Payne RM. The heart in Friedreich's Ataxia: Basic findings and clinical implications. *Prog Pediatr Cardiol*, 31, 103–109 (2011).
 58. Delatycki MB, Corben LA. Clinical Features of Friedreich Ataxia. *J Child Neurol*, 27, 1133–1137 (2012).
 59. Regner SR, Lagedrost SJ, Plappert T, et al. Analysis of echocardiograms in a large heterogeneous cohort of patients with Friedreich ataxia. *Am J Cardiol*, 109, 401–405 (2012).
 60. Weidemann F, Rummey C, Bijmens B, et al. The Heart in Friedreich Ataxia. *Circulation*, 125, 1626–1634 (2012).
 61. Michael S, Petrocine S V., Qian J, et al. Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum*, 5, 257–267 (2006).
 62. Lane DJR, Huang ML-H, Ting S, et al. Biochemistry of cardiomyopathy in the mitochondrial disease Friedreich's ataxia. *Biochem J*, 453, 321–336 (2013).
 63. Abeti R, Parkinson MH, Hargreaves IP, et al. "Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich's ataxia". *Cell Death Dis*, 7, e2237 (2016).
 64. Wagner GR, Melanie Pride P, Babbey CM, et al. Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase. *Hum Mol Genet*, 21, 2688–2697 (2012).
 65. Clark E, Johnson J, Dong YN, et al. Role of frataxin protein deficiency and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia, an autosomal recessive mitochondrial disease. *Neuronal Signal*, 2, NS20180060 (2018).

66. Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, et al. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*, 59, 554–560 (1996).
67. Hewer RL, Robinson N. Diabetes mellitus in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 31, 226–231 (1968).
68. McCormick A, Farmer J, Perlman S, et al. Impact of diabetes in the Friedreich ataxia clinical outcome measures study. *Ann Clin Transl Neurol*, 4, 622–631 (2017).
69. Fantus IG, Janjua N, Senni H, et al. Glucose intolerance in first-degree relatives of patients with Friedreich's ataxia is associated with insulin resistance: Evidence for a closely linked inherited trait. *Metabolism*, 40, 788–793 (1991).
70. Ristow M, Mulder H, Pomplun D, et al. Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of β cell mass. *J Clin Invest*, 112, 527–534 (2003).
71. Wolf NI, Koenig M. Progressive cerebellar atrophy. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 113, pp. 1869–1878 (2013).
72. Chevis CF, Da Silva CB, D'Abreu A, et al. Spinal cord atrophy correlates with disability in Friedreich's ataxia. *Cerebellum*, 12, 43–47 (2013).
73. Mascalchi M. The cerebellum looks normal in Friedreich ataxia. *AJNR Am J Neuroradiol*, 34, E22 (2013).
74. Ackroyd RS, Finnegan JA, Green SH. Friedreich's ataxia. A clinical review with neurophysiological and echocardiographic findings. *Arch Dis Child*, 59, 217–221 (1984).
75. Delatycki MB. Evaluating the progression of Friedreich ataxia and its treatment. *J Neurol*, 256, 36–41 (2009).
76. Schulz JB, Boesch S, Bürk K, et al. Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol*, 5, 222–234 (2009).
77. Bürk K, Mälzig U, Wolf S, et al. Comparison of three clinical rating scales in Friedreich Ataxia (FRDA). *Mov Disord*, 24, 1779–1784 (2009).
78. Trouillas P, Takayanagi T, Hallett M, et al. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. *J Neurol Sci*, 145, 205–211 (1997).
79. Storey E, Tuck K, Hester R, et al. Inter-rater reliability of the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS). *Mov Disord*, 19, 190–192 (2004).
80. Bürk K, Schulz SR, Schulz JB. Monitoring progression in Friedreich ataxia (FRDA): the use of clinical scales. *J Neurochem*, 126, 118–124 (2013).
81. Subramony SH, May W, Lynch D, et al. Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale. *Neurology*, 64, 1261–1262 (2005).
82. Lynch DR, Farmer JM, Tsou AY, et al. Measuring Friedreich ataxia: Complementary features of examination and performance measures. *Neurology*, 66, 1711–1716 (2006).

83. Schmitz-Hübsch T, Du Montcel ST, Baliko L, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: Development of a new clinical scale. *Neurology*, 66, 1717–1720 (2006).
84. Schmitz-Hübsch T, Fimmers R, Rakowicz M, et al. Responsiveness of different rating instruments in spinocerebellar ataxia patients. *Neurology*, 74, 678–684 (2010).
85. Weyer A, Abele M, Schmitz-Hübsch T, et al. Reliability and validity of the scale for the assessment and rating of ataxia: A study in 64 ataxia patients. *Mov Disord*, 22, 1633–1637 (2007).
86. Delatycki MB, Knight M, Koenig M, et al. G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder. *Hum Genet*, 105, 343–346 (1999).
87. Galea CA, Huq A, Lockhart PJ, et al. Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia. *Ann Neurol*, 79, 485–495 (2016).
88. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am J Hum Genet*, 60, 1251–6 (1997).
89. Gellera C, Castellotti B, Mariotti C, et al. Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics*, 8, 289–299 (2007).
90. Lamba LD, Ciotti P, Giribaldi G, et al. Friedreich's Ataxia: A New Mutation in Two Compound Heterozygous Siblings with Unusual Clinical Onset. *Eur Neurol*, 61, 240–243 (2009).
91. Anheim M, Mariani LL, Calvas P, et al. Exonic deletions of FXN and early-onset friedreich ataxia. *Arch Neurol*, 69, 912–916 (2012).
92. Cossée M, Schmitt M, Campuzano V, et al. Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7452–7457 (1997).
93. Montermini L, Richter A, Morgan K, et al. Phenotypic variability in friedreich ataxia: Role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Ann Neurol*, 41, 675–682 (1997).
94. Parkinson MH, Boesch S, Nachbauer W, et al. Clinical features of Friedreich's ataxia: classical and atypical phenotypes. *J Neurochem*, 126, 103–117 (2013).
95. Monrós E, Moltó MD, Martínez F, et al. Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am J Hum Genet*, 61, 101–110 (1997).
96. Isnard R, Kalotka H, Dürr A, et al. Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation*, 95, 2247–2249 (1997).
97. Montermini L, Kish SJ, Jiralerspong S, et al. Somatic mosaicism for Friedreich's ataxia GAA triplet repeat expansions in the central nervous system. *Neurology*, 49, 606–610 (1997).
98. Long A, Napierala JS, Polak U, et al. Somatic instability of the expanded GAA repeats in Friedreich's ataxia. *PLoS One*, 12, e0189990 (2017).
99. De Biase I, Rasmussen A, Endres D, et al. Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann Neurol*, 61, 55–60 (2007).

100. Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, et al. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, 6, 1771–1780 (1997).
101. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. The GAA triplet-repeat expansion in friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet*, 62, 111–121 (1998).
102. Pianese L, Turano M, Lo Casale MS, et al. Real time PCR quantification of frataxin mRNA in the peripheral blood leucocytes of Friedreich ataxia patients and carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 1061–1063 (2004).
103. Chutake YK, Costello WN, Lam C, et al. Altered nucleosome positioning at the transcription start site and deficient transcriptional initiation in friedreich ataxia. *J Biol Chem*, 289, 15194–15202 (2014).
104. Li J, Begbie A, Boehm BJ, et al. Ion Mobility-Mass Spectrometry Reveals Details of Formation and Structure for GAA·TCC DNA and RNA Triplexes. *J Am Soc Mass Spectrom*, 30, 103–112 (2019).
105. Sakamoto N, Chastain PD, Parniewski P, et al. Sticky DNA: Self-association properties of long GAA · TTC repeats in R · R · Y triplex structures from Friedreich’s ataxia. *Mol Cell*, 3, 465–475 (1999).
106. Groh M, Lufino MMP, Wade-Martins R, et al. R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome. *PLoS Genet*, 10, e1004318 (2014).
107. De Biase I, Chutake YK, Rindler PM, et al. Epigenetic Silencing in Friedreich Ataxia Is Associated with Depletion of CTCF (CCCTC-Binding Factor) and Antisense Transcription. *PLoS One*, 4, e7914 (2009).
108. Mikaeili H, Sandi M, Bayot A, et al. FAST-1 antisense RNA epigenetically alters FXN expression. *Sci Rep*, 8, 17217 (2018).
109. Baralle M, Pastor T, Bussani E, et al. Influence of Friedreich Ataxia GAA Noncoding Repeat Expansions on Pre-mRNA Processing. *Am J Hum Genet*, 83, 77–88 (2008).
110. Zhang N, Ashizawa T. RNA toxicity and foci formation in microsatellite expansion diseases. *Curr Opin Genet Dev*, 44, 17–29 (2017).
111. Du J, Aleff RA, Soragni E, et al. RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. *J Biol Chem*, 290, 5979–5990 (2015).
112. Kim E, Napierala M, Dent SYR. Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich’s ataxia. *Nucleic Acids Res*, 39, 8366–8377 (2011).
113. Kumari D, Biacsi RE, Usdin K. Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in Friedreich ataxia cells. *J Biol Chem*, 286, 4209–4215 (2011).

114. Greene E, Mahishi L, Entezam A, et al. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*, 35, 3383–3390 (2007).
115. Herman D, Jentsen K, Burnett R, et al. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*, 2, 551–558 (2006).
116. Evans-Galea M V., Carrodus N, Rowley SM, et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol*, 71, 487–497 (2012).
117. Savellev A, Everett C, Sharpe T, et al. DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature*, 422, 909–913 (2003).
118. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, et al. DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J Med Genet*, 45, 808–812 (2008).
119. Montermini L, Andermann E, Labuda M, et al. The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: Premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet*, 6, 1261–1266 (1997).
120. Greene E, Entezam A, Kumari D, et al. Ancient repeated DNA elements and the regulation of the human frataxin promoter. *Genomics*, 85, 221–230 (2005).
121. Puspasari N, Rowley SM, Gordon L, et al. Long Range Regulation of Human FXN Gene Expression. *PLoS One*, 6, e22001 (2011).
122. Li K, Singh A, Crooks DR, et al. Expression of Human Frataxin Is Regulated by Transcription Factors SRF and TFAP2. *PLoS One*, 5, e12286 (2010).
123. Li K, Besse EK, Ha D, et al. Iron-dependent regulation of frataxin expression: Implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 17, 2265–2273 (2008).
124. Zhou ZD, Tan E-K. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*, 12, 75 (2017).
125. Khan MA, Walden WE, Theil EC, et al. Thermodynamic and Kinetic Analyses of Iron Response Element (IRE)-mRNA Binding to Iron Regulatory Protein, IRP1. *Sci Rep*, 7, 8532 (2017).
126. Pianese L, Tammaro A, Turano M, et al. Identification of a novel transcript of X25, the human gene involved in Friedreich ataxia. *Neurosci Lett*, 320, 137–140 (2002).
127. Xia H, Cao Y, Dai X, et al. Novel Frataxin Isoforms May Contribute to the Pathological Mechanism of Friedreich Ataxia. *PLoS One*, 7, e47847 (2012).
128. Gibson TJ, Koonin E V., Musco G, et al. Friedreich's ataxia protein: Phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci*, 19, 465–468 (1996).
129. Cossée M, Puccio H, Gansmuller A, et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, 9, 1219–1226 (2000).
130. Willis JH, Isaya G, Gakh O, et al. Lateral-flow immunoassay for the frataxin protein in Friedreich's ataxia patients and carriers. *Mol Genet Metab*, 94, 491–497 (2008).

131. Saccà F, Puorro G, Antenora A, et al. A Combined Nucleic Acid and Protein Analysis in Friedreich Ataxia: Implications for Diagnosis, Pathogenesis and Clinical Trial Design. *PLoS One*, 6, e17627 (2011).
132. Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, et al. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, 16, 345–351 (1997).
133. Babcock M, de Silva D, Oaks R, et al. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, 276, 1709–1712 (1997).
134. Mühlhoff U, Richhardt N, Gerber J, et al. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem*, 277, 29810–29816 (2002).
135. Puccio H, Simon D, Cossée M, et al. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*, 27, 181–186 (2001).
136. Lesuisse E, Santos R, Matzanke BF, et al. Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet*, 12, 879–889 (2003).
137. Yoon T, Cowan JA. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem*, 279, 25943–25946 (2004).
138. Park S, Gakh O, O'Neill HA, et al. Yeast Frataxin Sequentially Chaperones and Stores Iron by Coupling Protein Assembly with Iron Oxidation. *J Biol Chem*, 278, 31340–31351 (2003).
139. Paupe V, Dassa EP, Goncalves S, et al. Impaired Nuclear Nrf2 Translocation Undermines the Oxidative Stress Response in Friedreich Ataxia. *PLoS One*, 4, e4253 (2009).
140. Branda SS, Cavadini P, Adamec J, et al. Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem*, 274, 22763–22769 (1999).
141. Cavadini P, Adamec J, Taroni F, et al. Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase: Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem*, 275, 41469–41475 (2000).
142. Koutnikova H, Campuzano V, Koenig M. Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum Mol Genet*, 7, 1485–1489 (1998).
143. Condo I, Ventura N, Malisan F, et al. A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J Biol Chem*, 281, 16750–16756 (2006).
144. Condò I, Malisan F, Guccini I, et al. Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin. *Hum Mol Genet*, 19, 1221–1229 (2010).
145. Guo L, Wang Q, Weng L, et al. Characterization of a new N-terminally acetylated extra-mitochondrial isoform of frataxin in human erythrocytes. *Sci Rep*, 8, 17043 (2018).

146. Musco G, Stier G, Kolmerer B, et al. Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: Solution structure of frataxin. *Structure*, 8, 695–707 (2000).
147. Pastore A, Puccio H. Frataxin: a protein in search for a function. *J Neurochem*, 126, 43–52 (2013).
148. Prischi F, Giannini C, Adinolfi S, et al. The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *FEBS J*, 276, 6669–6676 (2009).
149. Sirano DP, Shigeta R, Chi YI, et al. Crystal structure of human frataxin. *J Biol Chem*, 275, 30753–30756 (2000).
150. Adamec J, Rusnak F, Owen WG, et al. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: Implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*, 67, 549–562 (2000).
151. Adinolfi S, Trifuoggi M, Politou AS, et al. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet*, 11, 1865–1877 (2002).
152. Bou-Abdallah F, Adinolfi S, Pastore A, et al. Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 341, 605–615 (2004).
153. Cavadini P, O'Neill HA, Benada O, et al. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 11, 217–227 (2002).
154. Cook JD, Bencze KZ, Jankovic AD, et al. Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry*, 45, 7767–7777 (2006).
155. Yoon T, Cowan JA. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc*, 125, 6078–6084 (2003).
156. Bencze KZ, Kondapalli KC, Cook JD, et al. The Structure and Function of Frataxin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41, 269–291 (2006).
157. Knight SAB, Sepuri NB V., Pain D, et al. Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J Biol Chem*, 273, 18389–18393 (1998).
158. Condò I, Ventura N, Malisan F, et al. In vivo maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet*, 16, 1534–1540 (2007).
159. Schmucker S, Argentini M, Carelle-Calmels N, et al. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet*, 17, 3521–3531 (2008).
160. Yoon T, Dizin E, Cowan JA. N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: Regulation of iron binding and complex formation with target proteins. *J Biol Inorg Chem*, 12, 535–542 (2007).
161. Pérez-Luz S, Gimenez-Cassina A, Fernández-Frías I, et al. Delivery of the 135 kb human frataxin genomic DNA locus gives rise to different frataxin isoforms. *Genomics*, 106, 76–82 (2015).
162. Abruzzo PM, Marini M, Bolotta A, et al. Frataxin mRNA Isoforms in FRDA Patients and Normal Subjects: Effect of Tocotrienol Supplementation. *Biomed Res Int*, 2013, 1–9 (2013).
163. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the

- associated pathologies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1852, 1347–1359 (2015).
164. Hadzhieva M, Kirches E, Mawrin C. Review: Iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40, 240–257 (2014).
165. Huang ML-H, Lane DJR, Richardson DR. Mitochondrial Mayhem: The Mitochondrion as a Modulator of Iron Metabolism and Its Role in Disease. *Antioxid Redox Signal*, 15, 3003–3019 (2011).
166. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, 1790, 589–599 (2009).
167. Campanella A, Isaya G, O'Neill HA, et al. The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet*, 13, 2279–2288 (2004).
168. Aloria K, Schilke B, Andrew A, et al. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep*, 5, 1096–1101 (2004).
169. Pastore C, Franzese M, Sica F, et al. Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein - A study of bacterial frataxin. *FEBS J*, 274, 4199–4210 (2007).
170. Seguin A, Sutak R, Bulteau AL, et al. Evidence that yeast frataxin is not an iron storage protein in vivo. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1802, 531–538 (2010).
171. Chen OS, Hemenway S, Kaplan J. Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: Evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12321–12326 (2002).
172. Lane DJR, Merlot AM, Huang ML-H, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 1853, 1130–1144 (2015).
173. Braymer JJ, Lill R. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem*, 292, 12754–12763 (2017).
174. Busi M V., Gomez-Casati DF. Exploring frataxin function. *IUBMB Life*, 64, 56–63 (2012).
175. Wang T, Craig EA. Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *J Biol Chem*, 283, 12674–12679 (2008).
176. Cook JD, Kondapalli KC, Rawat S, et al. Molecular details of the yeast frataxin-Isu1 interaction during mitochondrial Fe-S cluster assembly. *Biochemistry*, 49, 8756–8765 (2010).
177. Gerber J, Mühlenhoff U, Lill R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep*, 4, 906–911 (2003).
178. Ramazzotti A, Vanmansart V, Foury F. Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 557, 215–220 (2004).
179. Kondapalli KC, Kok NM, Dancis A, et al. *Drosophila* frataxin: An iron chaperone during cellular

- Fe-S cluster bioassembly. *Biochemistry*, 47, 6917–6927 (2008).
180. Tsai CL, Barondeau DP. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry*, 49, 9132–9139 (2010).
181. Galeano BK, Ranatunga W, Gakh O, et al. Zinc and the iron donor frataxin regulate oligomerization of the scaffold protein to form new Fe-S cluster assembly centers. *Metallomics*, 9, 773–801 (2017).
182. Schmucker S, Martelli A, Colin F, et al. Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *PLoS One*, 6, e16199 (2011).
183. Bridwell-Rabb J, Fox NG, Tsai CL, et al. Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry*, 53, 4904–4913 (2014).
184. Pandey A, Gordon DM, Pain J, et al. Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J Biol Chem*, 288, 36773–36786 (2013).
185. Llorens J V., Navarro JA, Martínez-Sebastián MJ, et al. Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *FASEB J*, 21, 333–344 (2007).
186. Seznec H, Simon D, Monassier L, et al. Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 13, 1017–1024 (2004).
187. Alsina D, Ros J, Tamarit J. Nitric oxide prevents Aft1 activation and metabolic remodeling in frataxin-deficient yeast. *Redox Biol*, 14, 131–141 (2018).
188. Moreno-Cermeño A, Alsina D, Cabisco E, et al. Metabolic remodeling in frataxin-deficient yeast is mediated by Cth2 and Adr1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 1833, 3326–3337 (2013).
189. Bencze KZ, Yoon T, Millán-Pacheco C, et al. Human frataxin: iron and ferroxidase binding surface. *Chem Commun*, 1798–1800 (2007).
190. Schoenfeld RA, Napoli E, Wong A, et al. Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Hum Mol Genet*, 14, 3787–3799 (2005).
191. Steinkellner H, Singh HN, Muckenthaler MU, et al. No changes in heme synthesis in human Friedreich's ataxia erythroid progenitor cells. *Gene*, 621, 5–11 (2017).
192. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Varshney D, et al. GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics*, 88, 580–590 (2006).
193. Emond M, Lepage G, Vanasse M, et al. Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology*, 55, 1752–1753 (2000).
194. Obis E, Irazusta V, Sanchís D, et al. Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets

- mitochondria and lipid metabolism. *Free Radic Biol Med*, 73, 21–33 (2014).
195. Pandolfo M. Drug Insight: antioxidant therapy in inherited ataxias. *Nat Clin Pract Neurol*, 4, 86–96 (2008).
196. Wong A, Yang J, Cavadini P, et al. The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet*, 8, 425–430 (1999).
197. Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, et al. Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur J Clin Invest*, 31, 1007–1011 (2001).
198. Park S, Gakh O, O'Neill HA, et al. Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem*, 278, 31340–31351 (2003).
199. Paupé V, Dassa EP, Gonçalves S, et al. Impaired Nuclear Nrf2 Translocation Undermines the Oxidative Stress Response in Friedreich Ataxia. *PLoS One*, 4, e4253 (2009).
200. Shan Y, Schoenfeld RA, Hayashi G, et al. Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's Ataxia YG8R mouse model. *Antioxidants Redox Signal*, 19, 1481–1493 (2013).
201. D'Oria V, Petrini S, Travaglini L, et al. Frataxin deficiency leads to reduced expression and impaired translocation of NF-E2-Related factor (Nrf2) in cultured motor neurons. *Int J Mol Sci*, 14, 7853–7865 (2013).
202. Lodi R, Cooper JM, Bradley JL, et al. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11492–11495 (1999).
203. Lodi R, Hart PE, Rajagopalan B, et al. Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol*, 49, 590–596 (2001).
204. Richardson DR, Lane DJR, Becker EM, et al. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 10775–10782 (2010).
205. Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: The Next (Neurode)Generation. *Neuron*, 70, 1033–1053 (2011).
206. Hick A, Wattenhofer-Donzé M, Chintawar S, et al. Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *DMM Dis Model Mech*, 6, 608–621 (2013).
207. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, et al. Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 9, 275–282 (2000).
208. Chen OS, Kaplan J. YFH1-mediated iron homeostasis is independent of mitochondrial respiration. *FEBS Lett*, 509, 131–134 (2001).
209. Foury F, Cazzalini O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with

- Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, 411, 373–377 (1997).
210. Wilson RB, Roof DM. Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial dna in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet*, 16, 352–357 (1997).
211. Radisky DC, Babcock MC, Kaplan J. The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux: Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem*, 274, 4497–4499 (1999).
212. Irazusta V, Cabisco E, Reverter-Branchat G, et al. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J Biol Chem*, 281, 12227–12232 (2006).
213. Bulteau A-L, Dancis A, Gareil M, et al. Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic Biol Med*, 42, 1561–1570 (2007).
214. Auchère F, Santos R, Planamente S, et al. Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 17, 2790–2802 (2008).
215. Cavadini P, Gellera C, Patel PI, et al. Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet*, 9, 2523–2530 (2000).
216. Moreno-Cermeño A, Obis È, Bellí G, et al. Frataxin depletion in yeast triggers up-regulation of iron transport systems before affecting iron-sulfur enzyme activities. *J Biol Chem*, 285, 41653–41664 (2010).
217. Gabrielli N, Ayté J, Hidalgo E. Cells Lacking Pfh1, a Fission Yeast Homolog of Mammalian Frataxin Protein, Display Constitutive Activation of the Iron Starvation Response. *J Biol Chem*, 287, 43042–43051 (2012).
218. Wang Y, Wang Y, Marcus S, et al. The role of frataxin in fission yeast iron metabolism: Implications for Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, 1840, 3022–3033 (2014).
219. Sturm B, Bistrich U, Schranzhofer M, et al. Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: A decrease in antioxidative capacity? *J Biol Chem*, 280, 6701–6708 (2005).
220. Halabi A, Fuselier KTB, Grabczyk E. GAA•TTC repeat expansion in human cells is mediated by mismatch repair complex MutL and depends upon the endonuclease domain in MLH3 isoform one. *Nucleic Acids Res*, 46, 4022–4032 (2018).
221. Lai Y, Beaver JM, Lorente K, et al. Base Excision Repair of Chemotherapeutically-Induced Alkylated DNA Damage Predominantly Causes Contractions of Expanded GAA Repeats Associated with Friedreich's Ataxia. *PLoS One*, 9, e93464 (2014).
222. Xu C, Soragni E, Chou CJ, et al. Chemical Probes Identify a Role for Histone Deacetylase 3 in Friedreich's Ataxia Gene Silencing. *Chem Biol*, 16, 980–989 (2009).
223. Cotticelli MG, Xia S, Kaur A, et al. Identification of p38 MAPK as a novel therapeutic target for Friedreich's ataxia. *Sci Rep*, 8, 5007 (2018).

224. Hayashi G, Cortopassi G. Lymphoblast Oxidative Stress Genes as Potential Biomarkers of Disease Severity and Drug Effect in Friedreich's Ataxia. *PLoS One*, 11, e0153574 (2016).
225. Bayot A, Reichman S, Lebon S, et al. Cis-silencing of PIP5K1B evidenced in friedreich's ataxia patient cells results in cytoskeleton anomalies. *Hum Mol Genet*, 22, 2894–2904 (2013).
226. Coppola G, Marmolino D, Lu D, et al. Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPAR γ pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 18, 2452–2461 (2009).
227. Heidari MM, Houshmand M, Hosseinkhani S, et al. Complex I and ATP content deficiency in lymphocytes from Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci*, 36, 26–31 (2009).
228. Jauslin ML, Wirth T, Meier T, et al. A cellular model for Friedreich Ataxia reveals small-molecule glutathione peroxidase mimetics as novel treatment strategy. *Hum Mol Genet*, 11, 3055–3063 (2002).
229. Jauslin ML, Meier T, Smith RAJ, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J*, 17, 1–10 (2003).
230. Bulteau AL, Planamente S, Jornea L, et al. Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in $\Delta yfh1$ yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1822, 212–225 (2012).
231. Tan G, Chen LS, Lonnerdal B, et al. Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells. *Hum Mol Genet*, 10, 2099–2107 (2001).
232. Fleming J, Spinoulas A, Zheng M, et al. Partial correction of sensitivity to oxidant stress in Friedreich ataxia patient fibroblasts by frataxin-encoding adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther*, 16, 947–956 (2005).
233. Zhao H, Li H, Hao S, et al. Peptide SS-31 upregulates frataxin expression and improves the quality of mitochondria: implications in the treatment of Friedreich ataxia. *Sci Rep*, 7, 9840 (2017).
234. Ku S, Soragni E, Campau E, et al. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAATTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, 7, 631–637 (2010).
235. Liu J, Verma PJ, Evans-Galea M V., et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Friedreich Ataxia Patients. *Stem Cell Rev Reports*, 7, 703–713 (2011).
236. Codazzi F, Hu A, Rai M, et al. Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Hum Mol Genet*, 25, 4847–4855 (2016).
237. Crombie DE, Pera MF, Delatycki MB, et al. Using human pluripotent stem cells to study Friedreich ataxia cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 212, 37–43 (2016).
238. Crombie DE, Curl CL, Raaijmakers AJA, et al. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cell-

- derived cardiomyocytes display electrophysiological abnormalities and calcium handling deficiency. *Aging (Albany NY)*, 9, 1440–1452 (2017).
239. Li Y, Polak U, Bhalla AD, et al. Excision of expanded GAA repeats alleviates the molecular phenotype of friedreich's ataxia. *Mol Ther*, 23, 1055–1065 (2015).
240. Soragni E, Miao W, Iudicello M, et al. Epigenetic Therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol*, 76, 489–508 (2014).
241. Lu C, Cortopassi G. Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron-sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts. *Arch Biochem Biophys*, 457, 111–122 (2007).
242. Palomo GM, Cerrato T, Gargini R, et al. Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Hum Mol Genet*, 20, 2807–2822 (2011).
243. Zanella I, Derosas M, Corrado M, et al. The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1782, 90–98 (2008).
244. Calmels N, Seznec H, Villa P, et al. Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen. *BMC Neurol*, 9, 46 (2009).
245. Santos MM, Ohshima K, Pandolfo M. Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet*, 10, 1935–1944 (2001).
246. Mincheva-Tasheva S, Obis E, Tamarit J, et al. Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein. *Hum Mol Genet*, 23, 1829–1841 (2014).
247. Igoillo-Esteve M, Gurgul-Convey E, Hu A, et al. Unveiling a common mechanism of apoptosis in β -cells and neurons in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 24, 2274–2286 (2015).
248. Katsu-Jiménez Y, Loría F, Corona JC, et al. Gene transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) prevents neurodegeneration triggered by FXN deficiency. *Mol Ther*, 24, 877–889 (2016).
249. Loría F, Díaz-Nido J. Frataxin knockdown in human astrocytes triggers cell death and the release of factors that cause neuronal toxicity. *Neurobiol Dis*, 76, 1–12 (2015).
250. Vannocci T, Faggianelli N, Zaccagnino S, et al. A new cellular model to follow Friedreich's ataxia development in a time-resolved way. *DMM Dis Model Mech*, 8, 711–719 (2015).
251. Vázquez-Manrique RP, González-Cabo P, Ros S, et al. Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB J*, 20, 172–174 (2006).
252. Zarse K, Schulz TJ, Birringer M, et al. Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB J*, 21, 1271–1275 (2007).
253. Gonzalez-Cabo P, Ros S, Palau F. Flavin Adenine Dinucleotide Rescues the Phenotype of Frataxin Deficiency. *PLoS One*, 5, e8872 (2010).

254. Schiavi A, Torgovnick A, Kell A, et al. Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*. *Exp Gerontol*, 48, 191–201 (2013).
255. Schiavi A, Maglioni S, Palikaras K, et al. Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon Mitochondrial Stress in *C. elegans*. *Curr Biol*, 25, 1810–1822 (2015).
256. Cañizares J, Blanca JM, Navarro JA, et al. *dfh* is a *Drosophila* homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene*, 256, 35–42 (2000).
257. Calap-Quintana P, Navarro JA, González-Fernández J, et al. *Drosophila melanogaster* Models of Friedreich's Ataxia. *Biomed Res Int*, 2018, 1–20 (2018).
258. Anderson PR, Kirby K, Hilliker AJ, et al. RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, 14, 3397–3405 (2005).
259. Anderson PR, Kirby K, Orr WC, et al. Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 611–616 (2008).
260. Chen K, Lin G, Haelterman NA, et al. Loss of Frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *Elife*, 5, 1–24 (2016).
261. Navarro JA, Ohmann E, Sanchez D, et al. Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 19, 2828–2840 (2010).
262. Shidara Y, Hollenbeck PJ. Defects in mitochondrial axonal transport and membrane potential without increased reactive oxygen species production in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *J Neurosci*, 30, 11369–11378 (2010).
263. Soriano S, Llorens J V., Blanco-Sobero L, et al. Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Gene*, 521, 274–281 (2013).
264. Soriano S, Calap-Quintana P, Llorens JV, et al. Metal Homeostasis Regulators Suppress FRDA Phenotypes in a *Drosophila* Model of the Disease. *PLoS One*, 11, e0159209 (2016).
265. Tricoire H, Palandri A, Bourdais A, et al. Methylene blue rescues heart defects in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 23, 968–979 (2014).
266. Seguin A, Monnier V, Palandri A, et al. A Yeast/ *Drosophila* Screen to Identify New Compounds Overcoming Frataxin Deficiency. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 1–10 (2015).
267. Runko AP, Griswold AJ, Min KT. Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *FEBS Lett*, 582, 715–719 (2008).
268. Edenharter O, Clement J, Schneuwly S, et al. Overexpression of *Drosophila* frataxin triggers cell death in an iron-dependent manner. *J Neurogenet*, 31, 189–202 (2017).
269. Navarro JA, Llorens J V., Soriano S, et al. Overexpression of Human and Fly Frataxins in *Drosophila* Provokes Deleterious Effects at Biochemical, Physiological and Developmental Levels. *PLoS One*, 6, e21017 (2011).
270. Navarro JA, Botella JA, Metzendorf C, et al. Mitoferrin modulates iron toxicity in a *Drosophila*

- model of Friedreich's ataxia. *Free Radic Biol Med*, 85, 71–82 (2015).
271. Calap-Quintana P, Soriano S, Llorens JV, et al. TORC1 Inhibition by Rapamycin Promotes Antioxidant Defences in a Drosophila Model of Friedreich's Ataxia. *PLoS One*, 10, e0132376 (2015).
272. Simon D, Seznec H, Gansmuller A, et al. Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *J Neurosci*, 24, 1987–1995 (2004).
273. Martelli A, Friedman LS, Reutenauer L, et al. Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia. *DMM Dis Model Mech*, 5, 860–869 (2012).
274. Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, et al. Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett*, 512, 291–297 (2002).
275. Coppola G, Choi SH, Santos MM, et al. Gene expression profiling in frataxin deficient mice: Microarray evidence for significant expression changes without detectable neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 22, 302–311 (2006).
276. Lin H, Magrane J, Rattelle A, et al. Early cerebellar deficits in mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in the KIKO mouse model of Friedreich ataxia. *DMM Dis Model Mech*, 10, 1343–1352 (2017).
277. McMackin MZ, Henderson CK, Cortopassi GA. Neurobehavioral deficits in the KIKO mouse model of Friedreich's ataxia. *Behav Brain Res*, 316, 183–188 (2017).
278. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ruddle P, et al. GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics*, 84, 301–310 (2004).
279. Pook MA, Al-Mahdawi S, Carroll CJ, et al. Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics*, 3, 185–193 (2001).
280. Perdomini M, Hick A, Puccio H, et al. Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J Neurochem*, 126 Suppl, 65–79 (2013).
281. Virmouni SA, Ezzatizadeh V, Sandi C, et al. A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *DMM Dis Model Mech*, 8, 225–235 (2015).
282. Chandran V, Gao K, Swarup V, et al. Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's Ataxia. *Elife*, 6 (2017).
283. Piguet F, de Montigny C, Vaucamps N, et al. Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Mol Ther*, 26, 1940–1952 (2018).
284. Clark RM, De Biase I, Malykhina AP, et al. The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. *Hum Genet*, 120, 633–640 (2007).

285. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet*, 17, 735–746 (2007).
286. Sandi C, Pinto RM, Al-Mahdawi S, et al. Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol Dis*, 42, 496–505 (2011).
287. Anjomani Virmouni S, Sandi C, Al-Mahdawi S, et al. Cellular, Molecular and Functional Characterisation of YAC Transgenic Mouse Models of Friedreich Ataxia. *PLoS One*, 9, e107416 (2014).
288. Kemp KC, Cerminara N, Hares K, et al. Cytokine therapy-mediated neuroprotection in a Friedreich’s ataxia mouse model. *Ann Neurol*, 81, 212–226 (2017).
289. Mollá B, Riveiro F, Bolinches-Amorós A, et al. Two different pathogenic mechanisms, dying-back axonal neuropathy and pancreatic senescence, are present in the YG8R mouse model of Friedreich’s ataxia. *DMM Dis Model Mech*, 9, 647–657 (2016).
290. Mollá B, Muñoz-Lasso DC, Calap P, et al. Phosphodiesterase Inhibitors Revert Axonal Dystrophy in Friedreich’s Ataxia Mouse Model. *Neurotherapeutics*, 16, 432–449 (2019).
291. Chutake YK, Costello WN, Lam CC, et al. FXN Promoter Silencing in the Humanized Mouse Model of Friedreich Ataxia. *PLoS One*, 10, e0138437 (2015).
292. Ouellet DL, Cherif K, Rousseau J, et al. Deletion of the GAA repeats from the human frataxin gene using the CRISPR-Cas9 system in YG8R-derived cells and mouse models of Friedreich ataxia. *Gene Ther*, 24, 265–274 (2017).
293. Ilg W, Synofzik M, Brötz D, et al. Intensive coordinative training improves motor performance in degenerative cerebellar disease. *Neurology*, 73, 1823–1830 (2009).
294. Milne SC, Corben LA, Georgiou-Karistianis N, et al. Rehabilitation for Individuals With Genetic Degenerative Ataxia: A Systematic Review. *Neurorehabil Neural Repair*, 31, 609–622 (2017).
295. Pandolfo M, Hausmann L. Deferiprone for the treatment of Friedreich’s ataxia. *J Neurochem*, 126, 142–146 (2013).
296. Boddaert N, Sang KHLQ, Rötig A, et al. Selective iron chelation in Friedreich ataxia: Biologic and clinical implications. *Blood*, 110, 401–408 (2007).
297. Pandolfo M, Arpa J, Delatycki MB, et al. Deferiprone in Friedreich ataxia: A 6-month randomized controlled trial. *Ann Neurol*, 76, 509–521 (2014).
298. Cooper JM, Schapira AH V. Friedreich’s Ataxia: Disease mechanisms, antioxidant and Coenzyme Q 10 therapy. *BioFactors*, 18, 163–171 (2003).
299. Artuch R, Aracil A, Mas A, et al. Friedreich’s ataxia: Idebenone treatment in early stage patients. *Neuropediatrics*, 33, 190–193 (2002).

300. Buyse G, Mertens L, Di Salvo G, et al. Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: Neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology*, 60, 1679–1681 (2003).
301. Mariotti C, Solari A, Torta D, et al. Idebenone treatment in Friedreich patients: One-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 60, 1676–1679 (2003).
302. Pineda M, Arpa J, Montero R, et al. Idebenone treatment in paediatric and adult patients with Friedreich ataxia: Long-term follow-up. *Eur J Paediatr Neurol*, 12, 470–475 (2008).
303. Lagedrost SJ, Sutton MSJ, Cohen MS, et al. Idebenone in Friedreich ataxia cardiomyopathy—results from a 6-month phase III study (IONIA). *Am Heart J*, 161, 639–645 (2011).
304. Lynch DR, Perlman SL, Meier T. A phase 3, double-blind, placebo-controlled trial of idebenone in Friedreich Ataxia. *Arch Neurol*, 67, 941–947 (2010).
305. Arpa J, Sanz-Gallego I, Rodríguez-de-Rivera FJ, et al. Triple therapy with deferiprone, idebenone and riboflavin in Friedreich's ataxia - open-label trial. *Acta Neurol Scand*, 129, 32–40 (2014).
306. Parkinson MH, Schulz JB, Giunti P. Co-enzyme Q 10 and idebenone use in Friedreich's ataxia. *J Neurochem*, 126, 125–141 (2013).
307. Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: Consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem Int*, 58, 248–260 (2011).
308. Costantini A, Laureti T, Pala MI, et al. Long-term treatment with thiamine as possible medical therapy for Friedreich ataxia. *J Neurol*, 263, 2170–2178 (2016).
309. Botez MI, Young SN. Biogenic amine metabolites and thiamine in cerebrospinal fluid in heredo-degenerative ataxias. *Can J Neurol Sci*, 28, 134–140 (2001).
310. Pedraza OL, Botez MI. Thiamine status in inherited degenerative ataxias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 136–137 (1992).
311. Costantini A, Giorgi R, D'Agostino S, et al. High-dose thiamine improves the symptoms of Friedreich's ataxia. *Case Reports*, 2013 (2013).
312. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 46, 443–453 (2009).
313. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89–116 (2007).
314. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*, 88, 179–188 (2015).
315. Petrillo S, D'Amico J, La Rosa P, et al. Targeting NRF2 for the Treatment of Friedreich's Ataxia: A Comparison among Drugs. *Int J Mol Sci*, 20, 5211 (2019).
316. Anzovino A, Chiang S, Brown BE, et al. Molecular Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: An Impaired Nrf2 Response Mediated via Upregulation of Keap1 and Activation

- of the Gsk3 β Axis. *Am J Pathol*, 187, 2858–2875 (2017).
317. Abeti R, Baccaro A, Esteras N, et al. Novel Nrf2-Inducer Prevents Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia Models. *Front Cell Neurosci*, 12, 188 (2018).
318. Lynch DR, Farmer J, Hauser L, et al. Safety, pharmacodynamics, and potential benefit of omaveloxolone in Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol*, 6, 15–26 (2019).
319. Enns GM, Kinsman SL, Perlman SL, et al. Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with EPI-743. *Mol Genet Metab*, 105, 91–102 (2012).
320. Zesiewicz T, Salemi JL, Perlman S, et al. Double-blind, randomized and controlled trial of EPI-743 in Friedreich's ataxia. *Neurodegener Dis Manag*, 8, 233–242 (2018).
321. Cotticelli MG, Crabbe AM, Wilson RB, et al. Insights into the role of oxidative stress in the pathology of friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biol*, 1, 398–404 (2013).
322. Zesiewicz T, Heerinckx F, De Jager R, et al. Randomized, clinical trial of RT001: Early signals of efficacy in Friedreich's ataxia. *Mov Disord*, 33, 1000–1005 (2018).
323. Marmolino D, Acquaviva F, Pinelli M, et al. PPAR- γ agonist azelaoyl PAF increases frataxin protein and mRNA expression. new implications for the Friedreich's Ataxia Therapy. *Cerebellum*, 8, 98–103 (2009).
324. Marmolino D, Manto M, Acquaviva F, et al. PGC-1alpha Down-Regulation Affects the Antioxidant Response in Friedreich's Ataxia. *PLoS One*, 5, e10025 (2010).
325. García-Giménez JL, Sanchis-Gomar F, Pallardó F V. Could thiazolidinediones increase the risk of heart failure in Friedreich's ataxia patients? *Mov Disord*, 26, 769–771 (2011).
326. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem*, 166, 502–513 (2019).
327. Tang H, Shi W, Fu S, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*, 7, 1070–1080 (2018).
328. Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, et al. Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther*, 8, 705–726 (2017).
329. Hayashi G, Jasoliya M, Sahdeo S, et al. Dimethyl fumarate mediates Nrf2-dependent mitochondrial biogenesis in mice and humans. *Hum Mol Genet*, 26, 2864–2873 (2017).
330. Jasoliya M, Sacca F, Sahdeo S, et al. Dimethyl fumarate dosing in humans increases frataxin expression: A potential therapy for Friedreich's Ataxia. *PLoS One*, 14, e0217776 (2019).
331. Vyas PM, Tomamichel WJ, Pride PM, et al. A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum Mol Genet*, 21, 1230–1247 (2012).
332. Britti E, Delaspre F, Feldman A, et al. Frataxin-deficient neurons and mice models of Friedreich

- ataxia are improved by TAT-MTScs-FXN treatment. *J Cell Mol Med*, 22, 834–848 (2018).
333. Acquaviva F, Castaldo I, Filla A, et al. Recombinant human erythropoietin increases frataxin protein expression without increasing mRNA expression. *Cerebellum*, 7, 360–365 (2008).
334. Sturm B, Helminger M, Steinkellner H, et al. Carbamylated erythropoietin increases frataxin independent from the erythropoietin receptor. *Eur J Clin Invest*, 40, 561–565 (2010).
335. Boesch S, Nachbauer W, Mariotti C, et al. Safety and tolerability of carbamylated erythropoietin in Friedreich’s ataxia. *Mov Disord*, 29, 935–939 (2014).
336. Boesch S, Sturm B, Hering S, et al. Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich’s ataxia: A clinical pilot trial. *Mov Disord*, 23, 1940–1944 (2008).
337. Mariotti C, Fancellu R, Caldarazzo S, et al. Erythropoietin in Friedreich ataxia: No effect on frataxin in a randomized controlled trial. *Mov Disord*, 27, 446–449 (2012).
338. Nachbauer W, Hering S, Seifert M, et al. Effects of Erythropoietin on Frataxin Levels and Mitochondrial Function in Friedreich Ataxia – a Dose–Response Trial. *The Cerebellum*, 10, 763–769 (2011).
339. Saccà F, Puorro G, Marsili A, et al. Long-term effect of epoetin alfa on clinical and biochemical markers in friedreich ataxia. *Mov Disord*, 31, 734–741 (2016).
340. Miller JL, Rai M, Frigon NL, et al. Erythropoietin and small molecule agonists of the tissue-protective erythropoietin receptor increase FXN expression in neuronal cells in vitro and in Fxn-deficient KIKO mice in vivo. *Neuropharmacology*, 123, 34–45 (2017).
341. Rufini A, Fortuni S, Arcuri G, et al. Preventing the ubiquitin-proteasome-dependent degradation of frataxin, the protein defective in Friedreich’s ataxia. *Hum Mol Genet*, 20, 1253–1261 (2011).
342. Rufini A, Cavallo F, Condò I, et al. Highly specific ubiquitin-competing molecules effectively promote frataxin accumulation and partially rescue the aconitase defect in Friedreich ataxia cells. *Neurobiol Dis*, 75, 91–99 (2015).
343. Benini M, Fortuni S, Condò I, et al. E3 Ligase RNF126 Directly Ubiquitinates Frataxin, Promoting Its Degradation: Identification of a Potential Therapeutic Target for Friedreich Ataxia. *Cell Rep*, 18, 2007–2017 (2017).
344. Alfedì G, Luffarelli R, Condò I, et al. Drug repositioning screening identifies etravirine as a potential therapeutic for friedreich’s ataxia. *Mov Disord*, 34, 323–334 (2019).
345. Chutake YK, Lam CC, Costello WN, et al. Reversal of epigenetic promoter silencing in Friedreich ataxia by a class I histone deacetylase inhibitor. *Nucleic Acids Res*, 44, 5095–5104 (2016).
346. Rai M, Soragni E, Jenssen K, et al. HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS One*, 3, e1958 (2008).
347. Rai M, Soragni E, Chou CJ, et al. Two New Pimelic Diphenylamide HDAC Inhibitors Induce Sustained Frataxin Upregulation in Cells from Friedreich’s Ataxia Patients and in a Mouse Model.

- PLoS One*, 5, e8825 (2010).
348. Libri V, Yandim C, Athanasopoulos S, et al. Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: An exploratory, open-label, dose-escalation study. *Lancet*, 384, 504–513 (2014).
349. Lynch DR, Fischbeck KH. Nicotinamide in Friedreich's ataxia: useful or not? *Lancet*, 384, 474–475 (2014).
350. Soragni E, Xu C, Plasterer HL, et al. Rationale for the Development of 2-Aminobenzamide Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutics for Friedreich Ataxia. *J Child Neurol*, 27, 1164–1173 (2012).
351. Soragni E, Xu C, Cooper A, et al. Evaluation of histone deacetylase inhibitors as therapeutics for neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol*, 793, 495–508 (2011).
352. Yiu EM, Tai G, Peverill RE, et al. An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels. *J Neurol*, 262, 1344–1353 (2015).
353. Tomassini B, Arcuri G, Fortuni S, et al. Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Hum Mol Genet*, 21, 2855–2861 (2012).
354. Wyller VB, Jacobsen K, Dahl MB, et al. Interferon gamma may improve cardiac function in Friedreich's ataxia cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 221, 376–378 (2016).
355. Lynch DR, Hauser L, McCormick A, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon- γ 1b in Friedreich Ataxia. *Ann Clin Transl Neurol*, 6, 546–553 (2019).
356. Wells M, Seyer L, Schadt K, et al. IFN- γ for Friedreich ataxia: present evidence. *Neurodegener Dis Manag*, 5, 497–504 (2015).
357. Marcotulli C, Fortuni S, Arcuri G, et al. GIFT-1, a phase IIa clinical trial to test the safety and efficacy of IFN γ administration in FRDA patients. *Neurol Sci*, 37, 361–364 (2016).
358. Seyer L, Greeley N, Foerster D, et al. Open-label pilot study of interferon gamma-1b in Friedreich ataxia. *Acta Neurol Scand*, 132, 7–15 (2015).
359. Li L, Matsui M, Corey DR. Activating frataxin expression by repeat-targeted nucleic acids. *Nat Commun*, 7, 10606 (2016).
360. Erwin GS, Grieshop MP, Ali A, et al. Synthetic transcription elongation factors license transcription across repressive chromatin. *Science*, 358, 1617–1622 (2017).
361. Chapdelaine P, Gérard C, Sanchez N, et al. Development of an AAV9 coding for a 3XFLAG-TALE frat#8 -VP64 able to increase in vivo the human frataxin in YG8R mice. *Gene Ther*, 23, 606–614 (2016).
362. Cherif K, Gérard C, Rousseau J, et al. Increased Frataxin Expression Induced in Friedreich Ataxia Cells by Platinum TALE-VP64s or Platinum TALE-SunTag. *Mol Ther - Nucleic Acids*, 12, 19–32 (2018).

363. Tremblay JP, Chapdelaine P, Coulombe Z, et al. Transcription activator-like effector proteins induce the expression of the frataxin gene. *Hum Gene Ther*, 23, 883–890 (2012).
364. Chapdelaine P, Coulombe Z, Chikh A, et al. A Potential New Therapeutic Approach for Friedreich Ataxia: Induction of Frataxin Expression With TALE Proteins. *Mol Ther - Nucleic Acids*, 2, e119 (2013).
365. Bon C, Luffarelli R, Russo R, et al. SINEUP non-coding RNAs rescue defective frataxin expression and activity in a cellular model of Friedreich's Ataxia. *Nucleic Acids Res*, 47, 10728–10743 (2019).
366. Deverman BE, Ravina BM, Bankiewicz KS, et al. Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. *Nat Rev Drug Discov*, 17, 641–659 (2018).
367. Perdomini M, Belbellaa B, Monassier L, et al. Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat Med*, 20, 542–547 (2014).
368. Belbellaa B, Reutenauer L, Monassier L, et al. Correction of half the cardiomyocytes fully rescue Friedreich ataxia mitochondrial cardiomyopathy through cell-autonomous mechanisms. *Hum Mol Genet*, 28, 1274–1285 (2019).
369. Gérard C, Xiao X, Filali M, et al. An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol Ther - Methods Clin Dev*, 1, 14044 (2014).
370. Gimenez-Cassina A, Wade-Martins R, Gomez-Sebastian S, et al. Infectious delivery and long-term persistence of transgene expression in the brain by a 135-kb iBAC-FXN genomic DNA expression vector. *Gene Ther*, 18, 1015–1019 (2011).
371. Gomez-Sebastian S, Gimenez-Cassina A, Diaz-Nido J, et al. Infectious delivery and expression of a 135kb human FRDA genomic DNA locus complements friedreich's ataxia deficiency in human cells. *Mol Ther*, 15, 248–254 (2007).
372. Ventosa M, Wu Z, Lim F. Sustained FXN expression in dorsal root ganglia from a nonreplicative genomic HSV-1 vector. *J Gene Med*, 19, 376–386 (2017).
373. Lim F, Palomo GM, Mauritz C, et al. Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector. *Mol Ther*, 15, 1072–1078 (2007).
374. Khonsari H, Schneider M, Al-Mahdawi S, et al. Lentivirus-mediated frataxin gene delivery reverses genome instability in Friedreich ataxia patient and mouse model fibroblasts. *Gene Ther*, 23, 846–856 (2016).
375. Nabhan JF, Wood KM, Rao VP, et al. Intrathecal delivery of frataxin mRNA encapsulated in lipid nanoparticles to dorsal root ganglia as a potential therapeutic for Friedreich's ataxia. *Sci Rep*, 6, 20019 (2016).
376. Evans-Galea M V., Pébay A, Dottori M, et al. Cell and Gene Therapy for Friedreich Ataxia: Progress to Date. *Hum Gene Ther*, 25, 684–693 (2014).

377. Jones J, Estirado A, Redondo C, et al. Stem Cells from Wildtype and Friedreich's Ataxia Mice Present Similar Neuroprotective Properties in Dorsal Root Ganglia Cells. *PLoS One*, 8, e62807 (2013).
378. Jones J, Estirado A, Redondo C, et al. Mesenchymal stem cells improve motor functions and decrease neurodegeneration in ataxic mice. *Mol Ther*, 23, 130–138 (2015).
379. Kemp K, Mallam E, Hares K, et al. Mesenchymal Stem Cells Restore Frataxin Expression and Increase Hydrogen Peroxide Scavenging Enzymes in Friedreich Ataxia Fibroblasts. *PLoS One*, 6, e26098 (2011).
380. Dey R, Kemp K, Gray E, et al. Human mesenchymal stem cells increase anti-oxidant defences in cells derived from patients with friedreich's ataxia. *Cerebellum*, 11, 861–871 (2012).
381. Kemp K, Dey R, Cook A, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Factors Restore Function to Human Frataxin-Deficient Cells. *Cerebellum*, 16, 840–851 (2017).
382. Kemp KC, Hares K, Redondo J, et al. Bone marrow transplantation stimulates neural repair in Friedreich's ataxia mice. *Ann Neurol*, 83, 779–793 (2018).
383. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 21, 255–272 (2020).
384. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. *J Am Med Assoc*, 285, 545–550 (2001).
385. Moore NA, Bracha P, Hussain RM, et al. Gene therapy for age-related macular degeneration. *Expert Opin Biol Ther*, 17, 1235–1244 (2017).
386. Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Hear Lung Circ*, 27, 1285–1300 (2018).
387. Martinez-Navio JM, Fuchs SP, Pantry SN, et al. Adeno-Associated Virus Delivery of Anti-HIV Monoclonal Antibodies Can Drive Long-Term Virologic Suppression. *Immunity*, 50, 567–575 (2019).
388. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet*, 12, 316–328 (2011).
389. Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age. *Science*, 359, eaan4672 (2018).
390. Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer D V. Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annu Rev Biomed Eng*, 17, 63–89 (2015).
391. Peng Z. Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Hum Gene Ther*, 16, 1016–1027 (2005).
392. Wilson JM. Gendicine: The First Commercial Gene Therapy Product; Chinese Translation of Editorial. *Hum Gene Ther*, 16, 1014–1015 (2005).
393. Büning H. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO Mol Med*, 5, 1–3 (2013).

394. Ylä-Herttua S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Mol Ther*, 20, 1831–1832 (2012).
395. Aiuti A, Roncarolo MG, Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*, 9, 737–740 (2017).
396. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 378, 439–448 (2018).
397. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 390, 849–860 (2017).
398. Keeler AM, Flotte TR. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu Rev Virol*, 6, 601–621 (2019).
399. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*, 377, 1713–1722 (2017).
400. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*, 1, 427–451 (2014).
401. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, et al. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet*, 8, 148–154 (1994).
402. McCown TJ, Xiao X, Li J, et al. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res*, 713, 99–107 (1996).
403. Weinberg MS, Samulski RJ, McCown TJ. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology*, 69, 82–88 (2013).
404. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther*, 14, 316–327 (2006).
405. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, et al. The family Parvoviridae. *Arch Virol*, 159, 1239–1247 (2014).
406. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*, 149, 754–755 (1965).
407. Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol*, 45, 555–564 (1983).
408. Cassinotti P, Weitzand M, Tratschin JD. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: Mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein. *Virology*, 167, 176–184 (1988).
409. Rose JA, Maizel J V., Inman JK, et al. Structural Proteins of Adenovirus-Associated Viruses. *J*

- Viol*, 8, 766–770 (1971).
410. Xie Q, Bu W, Bhatia S, et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10405–10410 (2002).
411. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 18, 358–378 (2019).
412. Lusby E, Fife KH, Berns KI. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol*, 34, 402–409 (1980).
413. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 10220–10225 (2010).
414. Nash K, Chen W, Muzyczka N. Complete In Vitro Reconstitution of Adeno-Associated Virus DNA Replication Requires the Minichromosome Maintenance Complex Proteins. *J Virol*, 82, 1458–1464 (2008).
415. Straus SE, Sebring ED, Rose JA. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus associated virus DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 742–746 (1976).
416. Sonntag F, Kother K, Schmidt K, et al. The Assembly-Activating Protein Promotes Capsid Assembly of Different Adeno-Associated Virus Serotypes. *J Virol*, 85, 12686–12697 (2011).
417. Smith RH. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther*, 15, 817–822 (2008).
418. Pillay S, Carette JE. Host determinants of adeno-associated viral vector entry. *Curr Opin Virol*, 24, 124–131 (2017).
419. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious Entry Pathway of Adeno-Associated Virus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J Virol*, 74, 2777–2785 (2000).
420. Bleker S, Sonntag F, Kleinschmidt JA. Mutational Analysis of Narrow Pores at the Fivefold Symmetry Axes of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids Reveals a Dual Role in Genome Packaging and Activation of Phospholipase A2 Activity. *J Virol*, 79, 2528–2540 (2005).
421. Kronenberg S, Böttcher B, von der Lieth CW, et al. A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini. *J Virol*, 79, 5296–5303 (2005).
422. Girod A, Wobus CE, Zádori Z, et al. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol*, 83, 973–978 (2002).
423. Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, et al. A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Dev Cell*, 1, 291–302 (2001).
424. Grieger JC, Johnson JS, Gurda-Whitaker B, et al. Surface-Exposed Adeno-Associated Virus Vp1-NLS Capsid Fusion Protein Rescues Infectivity of Noninfectious Wild-Type Vp2/Vp3 and Vp3-Only Capsids but Not That of Fivefold Pore Mutant Virions. *J Virol*, 81, 7833–7843 (2007).

425. Grieger JC, Snowdy S, Samulski RJ. Separate Basic Region Motifs within the Adeno-Associated Virus Capsid Proteins Are Essential for Infectivity and Assembly. *J Virol*, 80, 5199–5210 (2006).
426. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2211–2215 (1990).
427. Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, et al. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics*, 10, 831–834 (1991).
428. Linden RM, Ward P, Giraud C, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11288–11294 (1996).
429. Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, et al. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol*, 33, 739–748 (1980).
430. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J*, 10, 3941–3950 (1991).
431. Philpott NJ, Gomos J, Berns KI, et al. A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12381–12385 (2002).
432. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *J Virol*, 72, 2224–2232 (1998).
433. Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ. Novel Transcriptional Regulatory Signals in the Adeno-Associated Virus Terminal Repeat A/D Junction Element. *J Virol*, 74, 8732–8739 (2000).
434. Dong B, Nakai H, Xiao W. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol Ther*, 18, 87–92 (2010).
435. Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, 7, 2101–2112 (1996).
436. Hirsch ML, Agbandje-McKenna M, Jude Samulski R. Little Vector, Big Gene Transduction: Fragmented Genome Reassembly of Adeno-associated Virus. *Mol Ther*, 18, 6–8 (2010).
437. Lai Y, Yue Y, Duan D. Evidence for the failure of adeno-associated virus serotype 5 to package a viral genome ≥ 8.2 kb. *Mol Ther*, 18, 75–79 (2010).
438. Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther*, 18, 80–86 (2010).
439. McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annu Rev Genet*, 38, 819–845 (2004).
440. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, et al. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 70, 3227–3234 (1996).
441. Hastie E, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus at 50: A Golden Anniversary of Discovery, Research, and Gene Therapy Success—A Personal Perspective. *Hum Gene Ther*, 26, 257–265 (2015).

442. Duan D, Sharma P, Yang J, et al. Circular Intermediates of Recombinant Adeno-Associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-Term Episomal Persistence in Muscle Tissue. *J Virol*, 72, 8568–8577 (1998).
443. Schnepf BC, Jensen RL, Chen C-L, et al. Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues. *J Virol*, 79, 14793–14803 (2005).
444. Gao G, Vandenberghe L, Wilson J. New Recombinant Serotypes of AAV Vectors. *Curr Gene Ther*, 5, 285–297 (2005).
445. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*, 16, 1073–1080 (2008).
446. Bell CL, Vandenberghe LH, Bell P, et al. The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *J Clin Invest*, 121, 2427–2435 (2011).
447. Shen S, Bryant KD, Brown SM, et al. Terminal n-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus. *J Biol Chem*, 286, 13532–13540 (2011).
448. Huang L-Y, Halder S, Agbandje-McKenna M. Parvovirus glycan interactions. *Curr Opin Virol*, 7, 108–118 (2014).
449. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions. *J Virol*, 72, 1438–1445 (1998).
450. Kaludov N, Brown KE, Walters RW, et al. Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity. *J Virol*, 75, 6884–6893 (2001).
451. Walters RW, Yi SMP, Keshavjee S, et al. Binding of Adeno-associated Virus Type 5 to 2,3-Linked Sialic Acid is Required for Gene Transfer. *J Biol Chem*, 276, 20610–20616 (2001).
452. Qing K, Mah C, Hansen J, et al. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med*, 5, 71–77 (1999).
453. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med*, 5, 78–82 (1999).
454. Ling C, Lu Y, Kalsi JK, et al. Human hepatocyte growth factor receptor is a cellular coreceptor for adeno-associated virus serotype 3. *Hum Gene Ther*, 21, 1741–1747 (2010).
455. Di Pasquale G, Davidson BL, Stein CS, et al. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med*, 9, 1306–1312 (2003).
456. Akache B, Grimm D, Pandey K, et al. The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol*, 80, 9831–9836 (2006).
457. Dudek AM, Pillay S, Puschnik AS, et al. An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. *J Virol*, 92, e02213–e02217 (2018).
458. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, et al. Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV)

- Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity. *J Virol*, 76, 791–801 (2002).
459. Keiser NW, Yan Z, Zhang Y, et al. Unique characteristics of AAV1, 2, and 5 viral entry, intracellular trafficking, and nuclear import define transduction efficiency in HeLa cells. *Hum Gene Ther*, 22, 1433–1444 (2011).
460. Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*, 10, 302–317 (2004).
461. Taymans JM, Vandenberghe LH, Van Den Haute C, et al. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther*, 18, 195–206 (2007).
462. Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S. Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. *PLoS One*, 8, e76310 (2013).
463. Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, et al. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci Res*, 93, 144–157 (2015).
464. Mandel RJ, Burger C. Clinical trials in neurological disorders using AAV vectors: promises and challenges. *Curr Opin Mol Ther*, 6, 482–490 (2004).
465. Cearley CN, Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther*, 13, 528–537 (2006).
466. Gray SJ, Nagabhushan Kalburgi S, McCown TJ, et al. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther*, 20, 450–459 (2013).
467. Snyder BR, Gray SJ, Quach ET, et al. Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Hum Gene Ther*, 22, 1129–1135 (2011).
468. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*, 14, 45–53 (2006).
469. Duque S, Joussemet B, Riviere C, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther*, 17, 1187–1196 (2009).
470. Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, et al. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: Effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther*, 16, 89–96 (2008).
471. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*, 27, 59–65 (2009).
472. Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, et al. Preclinical differences of intravascular aav9 delivery to neurons and glia: A comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol Ther*, 19, 1058–

- 1069 (2011).
473. Bey K, Deniaud J, Dubreil L, et al. Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 Administration in Nonhuman Primates: Promising Routes and Vectors for Which Neurological Diseases? *Mol Ther - Methods Clin Dev*, 17, 771–784 (2020).
474. Cearley CN, Vandenberghe LH, Parente MK, et al. Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol Ther*, 16, 1710–1718 (2008).
475. Castle MJ, Gershenson ZT, Giles AR, et al. Adeno-associated virus serotypes 1, 8, and 9 share conserved mechanisms for anterograde and retrograde axonal transport. *Hum Gene Ther*, 25, 705–720 (2014).
476. Cearley CN, Wolfe JH. A single injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. *J Neurosci*, 27, 9928–9940 (2007).
477. Hollis ER, Kadoya K, Hirsch M, et al. Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. *Mol Ther*, 16, 296–301 (2008).
478. Bevan AK, Duque S, Foust KD, et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther*, 19, 1971–1980 (2011).
479. Zhang H, Yang B, Mu X, et al. Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol Ther*, 19, 1440–1448 (2011).
480. Foust KD, Wang X, McGovern VL, et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol*, 28, 271–274 (2010).
481. Fu H, Dirosario J, Killedar S, et al. Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol Ther*, 19, 1025–1033 (2011).
482. Passini MA, Bu J, Richards AM, et al. Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther*, 25, 619–630 (2014).
483. Klein RL, Muir DF, King MA, et al. Long-term actions of vector-derived nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor on choline acetyltransferase and Trk receptor levels in the adult rat basal forebrain. *Neuroscience*, 90, 815–821 (1999).
484. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*, 113, 797–806 (2009).
485. Rivera VM, Gao GP, Grant RL, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*, 105, 1424–1430 (2005).

486. Stieger K, Schroeder J, Provost N, et al. Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates. *Mol Ther*, 17, 516–523 (2009).
487. Leone P, Shera D, McPhee SWJ, et al. Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci Transl Med*, 4, 165ra163 (2012).
488. Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, et al. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*, 119, 3038–3041 (2012).
489. Tajes M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, et al. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol Membr Biol*, 31, 152–167 (2014).
490. Di Pasquale G, Chiorini JA. AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. *Mol Ther*, 13, 506–516 (2006).
491. Merkel SF, Andrews AM, Lutton EM, et al. Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood–brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells. *J Neurochem*, 140, 216–230 (2017).
492. Bors L, Erdő F. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Sci Pharm*, 87, 6 (2019).
493. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, et al. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum Gene Ther*, 27, 478–496 (2016).
494. Federici T, Taub JS, Baum GR, et al. Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther*, 19, 852–859 (2012).
495. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, et al. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 23, 382–389 (2011).
496. Wang H, Yang B, Qiu L, et al. Widespread spinal cord transduction by intrathecal injection of rAAV delivers efficacious RNAi therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 23, 668–681 (2014).
497. Muldoon LL, Alvarez JI, Begley DJ, et al. Immunologic Privilege in the Central Nervous System and the Blood–Brain Barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33, 13–21 (2013).
498. Schuster DJ, Dykstra JA, Riedl MS, et al. Biodistribution of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) vector after intrathecal and intravenous delivery in mouse. *Front Neuroanat*, 8, 42 (2014).
499. Vulchanova L, Schuster DJ, Belur LR, et al. Differential adeno-associated virus mediated gene transfer to sensory neurons following intrathecal delivery by direct lumbar puncture. *Mol Pain*, 6, 31 (2010).
500. Gray SJ. Gene therapy and neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, 68, 136–142 (2013).
501. Bailey RM, Armao D, Nagabhushan Kalburgi S, et al. Development of Intrathecal AAV9 Gene Therapy for Giant Axonal Neuropathy. *Mol Ther - Methods Clin Dev*, 9, 160–171 (2018).

502. Haurigot V, Marcó S, Ribera A, et al. Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J Clin Invest*, 123, 3254–3271 (2013).
503. Fu H, DiRosario J, Kang L, et al. Restoration of central nervous system α -N-acetylglucosaminidase activity and therapeutic benefits in mucopolysaccharidosis IIIB mice by a single intracisternal recombinant adeno-associated viral type 2 vector delivery. *J Gene Med*, 12, 624–633 (2010).
504. Hordeaux J, Hinderer C, Goode T, et al. Toxicology Study of Intra-Cisterna Magna Adeno-Associated Virus 9 Expressing Human Alpha-L-Iduronidase in Rhesus Macaques. *Mol Ther - Methods Clin Dev* (2018).
505. Loeb JE, Weitzman MD, Hope TJ. Enhancement of green fluorescent protein expression in adeno-associated virus with the woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element. *Methods Mol Biol*, 183, 331–340 (2002).
506. Armbruster N, Lattanzi A, Jeavons M, et al. Efficacy and biodistribution analysis of intracerebroventricular administration of an optimized scAAV9-SMN1 vector in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Mol Ther - Methods Clin Dev*, 3, 16060 (2016).
507. Hughes MP, Smith DA, Morris L, et al. AAV9 intracerebroventricular gene therapy improves lifespan, locomotor function and pathology in a mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. *Hum Mol Genet*, 27, 3079–3098 (2018).
508. Zerah M, Pigué F, Colle MA, et al. Intracerebral Gene Therapy Using AAVrh.10-hARSA Recombinant Vector to Treat Patients with Early-Onset Forms of Metachromatic Leukodystrophy: Preclinical Feasibility and Safety Assessments in Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 26, 113–124 (2015).
509. Tardieu M, Zérah M, Husson B, et al. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cdnas in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: Results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther*, 25, 506–516 (2014).
510. Fraldi A, Hemsley K, Crawley A, et al. Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIa mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. *Hum Mol Genet*, 16, 2693–2702 (2007).
511. Papadakis E, Nicklin S, Baker A, et al. Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy. *Curr Gene Ther*, 4, 89–113 (2005).
512. Xu R, Janson CG, Mastakov M, et al. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther*, 8, 1323–1332 (2001).
513. Kügler S, Meyn L, Holzmüller H, et al. Neuron-specific expression of therapeutic proteins: Evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. *Mol Cell Neurosci*, 17, 78–96 (2001).
514. Smith-Arica JR, Morelli AE, Larregina AT, et al. Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: Adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene

- expression. *Mol Ther*, 2, 579–587 (2000).
515. Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum Gene Ther*, 22, 1143–1153 (2011).
516. Lee Y, Messing A, Su M, et al. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*, 56, 481–493 (2008).
517. Gow A, Friedrich VL, Lazzarini RA. Myelin basic protein gene contains separate enhancers for oligodendrocyte and Schwann cell expression. *J Cell Biol*, 119, 605–616 (1992).
518. Cucchiaroni M, Ren XL, Perides G, et al. Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther*, 10, 657–667 (2003).
519. Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, et al. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Gene Med*, 6, S212–S222 (2004).
520. Husain T, Passini MA, Parente MK, et al. Long-term AAV vector gene and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell promoters. *Gene Ther*, 16, 927–932 (2009).
521. Norrman K, Fischer Y, Bonnamy B, et al. Quantitative Comparison of Constitutive Promoters in Human ES cells. *PLoS One*, 5, e12413 (2010).
522. Qin JY, Zhang L, Clift KL, et al. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS One*, 5, e10611 (2010).
523. Yew NS, Wysokenski DM, Wang KX, et al. Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells. *Hum Gene Ther*, 8, 575–584 (1997).
524. Wu Z, Sun J, Zhang T, et al. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther*, 16, 280–289 (2008).
525. Choi J-H, Yu N-K, Baek G-C, et al. Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging capacity and transgene expression in neurons. *Mol Brain*, 7, 17 (2014).
526. Ostedgaard LS, Rokhlina T, Karp PH, et al. A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2952–2957 (2005).
527. Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, et al. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhances transgene expression from adenovirus vectors. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, 1621, 266–271 (2003).
528. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck Hepatitis Virus Contains a Tripartite Posttranscriptional Regulatory Element. *J Virol*, 72, 5085–5092 (1998).
529. Paterna JC, Moccetti T, Mura A, et al. Influence of promoter and WHV post-transcriptional

- regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther*, 7, 1304–1311 (2000).
530. Fagoe ND, Eggers R, Verhaagen J, et al. A compact dual promoter adeno-associated viral vector for efficient delivery of two genes to dorsal root ganglion neurons. *Gene Ther*, 21, 242–252 (2014).
531. Vandenberghe L, Wilson J. AAV as An Immunogen. *Curr Gene Ther*, 7, 325–333 (2007).
532. Manno CS, Arruda VR, Pierce GF, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*, 12, 342–347 (2006).
533. Hinderer C, Katz N, Buza EL, et al. Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum Gene Ther*, 29, 285–298 (2018).
534. Mingozzi F, Maus M V., Hui DJ, et al. CD18+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med*, 13, 419–422 (2007).
535. Zhu J, Huang X, Yang Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adenoassociated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest*, 119, 2388–2398 (2009).
536. Ashley SN, Somanathan S, Giles AR, et al. TLR9 signaling mediates adaptive immunity following systemic AAV gene therapy. *Cell Immunol*, 346, 103997 (2019).
537. Mingozzi F, Anguela XM, Pavani G, et al. Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci Transl Med*, 5, 194ra92 (2013).
538. Asokan A, Samulski RJ. AAV does the shuffle. *Nat Biotechnol*, 24, 158–160 (2006).
539. Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol*, 34, 204–209 (2016).
540. Morabito G, Giannelli SG, Ordazzo G, et al. AAV-PHP.B-Mediated Global-Scale Expression in the Mouse Nervous System Enables GBA1 Gene Therapy for Wide Protection from Synucleinopathy. *Mol Ther*, 25, 2727–2742 (2017).
541. Jackson KL, Dayton RD, Deverman BE, et al. Better Targeting, Better Efficiency for Wide-Scale Neuronal Transduction with the Synapsin Promoter and AAV-PHP.B. *Front Mol Neurosci*, 9, 116 (2016).
542. Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci*, 20, 1172–1179 (2017).
543. Hordeaux J, Wang Q, Katz N, et al. The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Mol Ther*, 26, 664–668 (2018).
544. McIntosh JH, Cochrane M, Cobbold S, et al. Successful attenuation of humoral immunity to viral capsid and transgenic protein following AAV-mediated gene transfer with a non-depleting CD4 antibody and cyclosporine. *Gene Ther*, 19, 78–85 (2012).
545. Mingozzi F, Chen Y, Murphy SL, et al. Pharmacological Modulation of Humoral Immunity in a

- Nonhuman Primate Model of AAV Gene Transfer for Hemophilia B. *Mol Ther*, 20, 1410–1416 (2012).
546. Corti M, Elder M, Falk D, et al. B-cell depletion is protective against anti-AAV capsid immune response: a human subject case study. *Mol Ther - Methods Clin Dev*, 1, 14033 (2014).
547. Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther*, 22, 338–347 (2014).
548. Gadalla KK, Bailey ME, Spike RC, et al. Improved survival and reduced phenotypic severity following AAV9/MECP2 gene transfer to neonatal and juvenile male *Mecp2* knockout mice. *Mol Ther*, 21, 18–30 (2013).
549. Garg SK, Lioy DT, Cheval H, et al. Systemic delivery of MeCP2 rescues behavioral and cellular deficits in female mouse models of Rett syndrome. *J Neurosci*, 33, 13612–13620 (2013).
550. Belbellaa B, Reutenauer L, Messaddeq N, et al. High levels of frataxin overexpression leads to mitochondrial and cardiac toxicity in mouse models. *Mol Ther - Methods Clin Dev* (2020).
551. Vannocci T, Notario Manzano R, Beccalli O, et al. Adding a temporal dimension to the study of Friedreich's ataxia: the effect of frataxin overexpression in a human cell model. *Dis Model Mech*, 11, dmm032706 (2018).
552. Vannocci T, Dinarelli S, Girasole M, et al. A new tool to determine the cellular metabolic landscape: nanotechnology to the study of Friedreich's ataxia. *Sci Rep*, 9, 19282 (2019).
553. Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, et al. Frataxin overexpressing mice. *FEBS Lett*, 572, 281–288 (2004).
554. Seguin A, Bayot A, Dancis A, et al. Overexpression of the yeast frataxin homolog (Yfh1): Contrasting effects on iron-sulfur cluster assembly, heme synthesis and resistance to oxidative stress. *Mitochondrion*, 9, 130–138 (2009).
555. Piguet F, Alves S, Cartier N. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum Gene Ther*, 28, 988–1003 (2017).
556. Pérez-Berná AJ, Rodríguez MJ, Chichón FJ, et al. Structural Changes In Cells Imaged by Soft X-ray Cryo-Tomography During Hepatitis C Virus Infection. *ACS Nano*, 10, 6597–6611 (2016).
557. Groen J, Conesa JJ, Valcárcel R, et al. The cellular landscape by cryo soft X-ray tomography. *Biophys Rev*, 11, 611–619 (2019).
558. Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, 116, 71–76 (1996).
559. Agulleiro JJ, Fernandez JJ. Fast tomographic reconstruction on multicore computers. *Bioinformatics*, 27, 582–583 (2011).
560. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for

- exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25, 1605–1612 (2004).
561. Sánchez I, Balagué E, Matilla-Dueñas A. Ataxin-1 regulates the cerebellar bioenergetics proteome through the GSK3 β -mTOR pathway which is altered in Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). *Hum Mol Genet*, 25, 4021–4040 (2016).
562. Sánchez I, Pinol P, Corral-Juan M, et al. A novel function of ataxin-1 in the modulation of PP2A activity is dysregulated in the spinocerebellar ataxia type 1. *Hum Mol Genet*, 22, 3425–3437 (2013).
563. Gakh O, Bedekovics T, Duncan SF, et al. Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem*, 285, 38486–38501 (2010).
564. Piedra J, Ontiveros M, Miravet S, et al. Development of a rapid, robust, and universal PicoGreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther Methods*, 26, 35–42 (2015).
565. Homs J, Pagès G, Ariza L, et al. Intrathecal administration of IGF-I by AAVrh10 improves sensory and motor deficits in a mouse model of diabetic neuropathy. *Mol Ther - Methods Clin Dev*, 1, 7 (2014).
566. Matilla A, Roberson ED, Banfi S, et al. Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation. *J Neurosci*, 18, 5508–5516 (1998).
567. Corral-Juan M, Serrano-Munuera C, Rábano A, et al. Clinical, genetic and neuropathological characterization of spinocerebellar ataxia type 37. *Brain*, 141, 1981–1997 (2018).
568. Bandiera S, Cartault F, Jannot A-S, et al. Genetic Variations Creating MicroRNA Target Sites in the FXN 3'-UTR Affect Frataxin Expression in Friedreich Ataxia. *PLoS One*, 8, e54791 (2013).
569. Wang L, Tian D, Hu J, et al. MiRNA-145 Regulates the Development of Congenital Heart Disease Through Targeting FXN. *Pediatr Cardiol*, 37, 629–636 (2016).
570. Jasoliya MJ, McMackin MZ, Henderson CK, et al. Frataxin deficiency impairs mitochondrial biogenesis in cells, mice and humans. *Hum Mol Genet*, 26, 2627–2633 (2017).
571. González-Cabo P, Palau F. Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *J Neurochem*, 126, 53–64 (2013).
572. Purroy R, Britti E, Delaspre F, et al. Mitochondrial pore opening and loss of Ca²⁺ + exchanger NCLX levels occur after frataxin depletion. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1864, 618–631 (2018).
573. Bolinches-Amorós A, Mollá B, Pla-Martín D, et al. Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Front Cell Neurosci*, 8, 124 (2014).
574. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med*, 19, 49–57 (2015).
575. Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, et al. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated

- virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: Implications for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 10, 2295–2305 (1999).
576. Liu J, Jones KL, Sumer H, et al. Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. *Mol Reprod Dev*, 76, 580–586 (2009).
577. Wang R, Liang J, Jiang H, et al. Promoter-dependent enhanced green fluorescent protein expression during embryonic stem cell propagation and differentiation. *Stem Cells Dev*, 17, 279–289 (2008).
578. Vasily V, Janine A, Beata D, et al. Large volume intrathecal bolus: CSF pressure and implications for safety. *FASEB J* (2018).
579. Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, et al. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virol J*, 10, 74 (2013).
580. Lalonde R, Strazielle C. Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Res Rev*, 67, 252–259 (2011).
581. Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, et al. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, 10, 2061–2067 (2001).
582. Bradley JL, Homayoun S, Hart PE, et al. Role of Oxidative Damage in Friedreich's Ataxia. *Neurochem Res*, 29, 561–567 (2004).
583. Chen W, Hu Y, Ju D. Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharm Sin B*, 10, 1347–1359 (2020).
584. Misiorek JO, Schreiber AM, Urbanek-Trzeciak MO, et al. A Comprehensive Transcriptome Analysis Identifies FXN and BDNF as Novel Targets of miRNAs in Friedreich's Ataxia Patients. *Mol Neurobiol*, 57, 2639–2653 (2020).
585. Dantham S, Srivastava AK, Gulati S, et al. Differentially Regulated Cell-Free MicroRNAs in the Plasma of Friedreich's Ataxia Patients and Their Association with Disease Pathology. *Neuropediatrics*, 49, 35–43 (2018).
586. Turchi R, Tortolici F, Guidobaldi G, et al. Frataxin deficiency induces lipid accumulation and affects thermogenesis in brown adipose tissue. *Cell Death Dis*, 11, 51 (2020).
587. Ganjam GK, Bolte K, Matschke LA, et al. Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell Death Dis*, 10, 865 (2019).
588. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21, 3017–3023 (2001).
589. Sasaki S, Iwata M. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66, 10–16 (2007).
590. Guo CY, Sun L, Chen XP, et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative

- diseases. *Neural Regen Res*, 8, 2003–2014 (2013).
591. Martelli A, Schmucker S, Reutenauer L, et al. Iron Regulatory Protein 1 Sustains Mitochondrial Iron Loading and Function in Frataxin Deficiency. *Cell Metab*, 21, 311–323 (2015).
592. Chapa-Dubocq X, Makarov V, Javadov S. Simple kinetic model of mitochondrial swelling in cardiac cells. *J Cell Physiol*, 233, 5310–5321 (2018).
593. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 50, 222–233 (2011).
594. Blondin GA, Green DE. The mechanism of mitochondrial swelling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58, 612–619 (1967).
595. Britti E, Delaspre F, Tamarit J, et al. Mitochondrial calcium signalling and neurodegenerative diseases. *Neuronal Signal*, 2, 1–11 (2018).
596. Horton AA, Fairhurst S, Bus JS. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 18, 27–79 (1987).
597. Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*, 51, 1302–1319 (2011).
598. Faraj SE, Roman EA, Aran M, et al. The alteration of the C-terminal region of human frataxin distorts its structural dynamics and function. *FEBS J*, 281, 3397–3419 (2014).
599. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234, 187–208 (1999).
600. Rahim AA, Wong AMS, Hofer K, et al. Intravenous administration of AAV2/9 to the fetal and neonatal mouse leads to differential targeting of CNS cell types and extensive transduction of the nervous system. *FASEB J*, 25, 3505–3518 (2011).
601. Dirren E, Towne CL, Setola V, et al. Intracerebroventricular injection of adeno-associated virus 6 and 9 vectors for cell type-specific transgene expression in the spinal cord. *Hum Gene Ther*, 25, 109–120 (2014).
602. Xu L, Daly T, Gao C, et al. CMV- β -actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 α promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum Gene Ther*, 12, 563–573 (2001).
603. Bailey RM, Rozenberg A, Gray SJ. Comparison of high-dose intracisterna magna and lumbar puncture intrathecal delivery of AAV9 in mice to treat neuropathies. *Brain Res*, 1739, 146832 (2020).
604. Bey K, Ciron C, Dubreil L, et al. Efficient CNS targeting in adult mice by intrathecal infusion of single-stranded AAV9-GFP for gene therapy of neurological disorders. *Gene Ther*, 24, 325–332 (2017).
605. Towne C, Pertin M, Beggah AT, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 6 (rAAV2/6)-mediated gene transfer to nociceptive neurons through different routes of delivery. *Mol Pain*, 5, 52

- (2009).
606. Hammond SL, Leek AN, Richman EH, et al. Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. *PLoS One*, 12, e0188830 (2017).
 607. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 128, 309–316 (2011).
 608. Iloff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*, 4, 147ra111 (2012).
 609. Iloff JJ, Lee H, Yu M, et al. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest*, 123, 1299–1309 (2013).
 610. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*, 371, 1994–2004 (2014).
 611. Sobrevals L, Enguita M, Rodriguez C, et al. AAV vectors transduce hepatocytes in vivo as efficiently in cirrhotic as in healthy rat livers. *Gene Ther*, 19, 411–417 (2012).
 612. Mason MRJ, Ehlert EME, Eggers R, et al. Comparison of AAV serotypes for gene delivery to dorsal root ganglion neurons. *Mol Ther*, 18, 715–724 (2010).
 613. Xu Y, Gu Y, Wu P, et al. Efficiencies of transgene expression in nociceptive neurons through different routes of delivery of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, 14, 897–906 (2003).
 614. Glatzel M, Flechsig E, Navarro B, et al. Adenoviral and adeno-associated viral transfer of genes to the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 442–447 (2000).
 615. McLeod JG. An electrophysiological and pathological study of peripheral nerves in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci*, 12, 333–349 (1971).
 616. Caruso G, Santoro L, Perretti A, et al. Friedreich's ataxia: electrophysiological and histological findings. *Acta Neurol Scand*, 67, 26–40 (1983).
 617. Shoji H, Takao K, Hattori S, et al. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain*, 9, 11 (2016).
 618. Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, et al. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology*, 27, 914–923 (2002).
 619. McFadyen MP, Kusek G, Bolivar VJ, et al. Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotorod. *Genes, Brain Behav*, 2, 214–219 (2003).
 620. Filali M, Lalonde R, Gérard C, et al. Sensorimotor skills in Fxn KO/Mck mutants deficient for frataxin in muscle. *Brain Res*, 1608, 91–96 (2015).
 621. Cemal CK, Carroll CJ, Lawrence L, et al. YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet*, 11, 1075–

- 1094 (2002).
622. Watase K, Weeber EJ, Xu B, et al. A long CAG repeat in the mouse Sca1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*, 34, 905–919 (2002).
623. Martin LJ. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 3, 839–915 (2010).
624. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239–257 (1972).
625. Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: Recurring themes around protein handling: Apoptosis Review Series. *J Cell Mol Med*, 12, 2263–2280 (2008).
626. Ishizawa K, Lin WL, Tiseo P, et al. A qualitative and quantitative study of grumose degeneration in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 513–524 (2000).
627. Arai N. “Grumose degeneration” of the dentate nucleus. A light and electron microscopic study in progressive supranuclear palsy and dentatorubropallidoluysial atrophy. *J Neurol Sci*, 90, 131–145 (1989).
628. Arai N, Amano N, Iseki E, et al. Tardive dyskinesia with inflated neurons of the cerebellar dentate nucleus - Case reports and morphometric study. *Acta Neuropathol*, 73, 38–42 (1987).
629. Manjo G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am J Pathol*, 146, 3–15 (1995).
630. Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: Possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 459–471 (1999).
631. Rocca CJ, Goodman SM, Dulin JN, et al. Transplantation of wild-type mouse hematopoietic stem and progenitor cells ameliorates deficits in a mouse model of Friedreich’s ataxia. *Sci Transl Med*, 9, eaaj2347 (2017).