



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Inhibició del catabolisme de la lisina mitjançant teràpia gènica com a aproximació terapèutica per a l'Acidúria Glutàrica tipus 1

Eulàlia Segur i Bailach

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Inhibició del catabolisme de la lisina mitjançant teràpia gènica com a aproximació terapèutica per a l'Acidúria Glutàrica tipus 1

Memòria presentada per

Eulàlia Segur i Bailach

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Programa de Biomedicina

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Cristina Fillat Fonts i la Dra. Judit Garcia Villòria, al grup de Teràpia Gènica i Càncer de la Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica – Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.

Doctoranda
Eulàlia Segur Bailach

Directora i Tutora
Cristina Fillat Fonts

Directora
Judit García Villòria

Barcelona, 2024



Clínic
Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



A la meva família i amistats,
i sobretot a l'Asociación Familias GA.

AGRAÏMENTS

Quantes vegades al llarg del camí de casa al laboratori he pensat en aquests agraïments. En què bonics i importants que són, i en la sort de tenir aquest espai per fer-vos participeu de la tesi a totes les que m'heu acompanyat durant aquest viatge! Escric aquests agraïments per manifestar-vos la meua gratitud i perquè quedi constància que tota aquesta feina és, en part, vostra.

A la **Cristina**, gràcies per obrir-me les portes al grup i confiar en mi per realitzar aquest projecte, i així permetre'm desenvolupar com a científica. Per guiar-me i ajudar-me a construir aquest treball, i tenir sempre la porta oberta al teu despatx per a qualsevol dubte o discussió de resultats on decidir quin seria el següent pas. He après moltíssim i guardaré sempre molt bons records tant de la part científica d'aquesta etapa, com a nivell personal del grup, i de totes les experiències de congressos i cursos que he tingut la oportunitat de gaudir!

A la **Judit**, gràcies per, tot i la distància, ser-hi sempre. Per transmetre'm la teua passió per les metabòliques i la determinació per la feina ben feta. Gràcies per tenir sempre un forat per ajudar-me quan ho he necessitat i fer-ho tot fàcil, i sempre amb un somriure!

A l'**Anna**, gràcies i mil gràcies, has sigut la meua mestra del laboratori. Quina sort que tenim d'haver-nos tingut l'una a l'altra a nivell científic i personal. Haver compartit les alegries dels resultats positius, els congressos i viatges, però també els nervis i les inseguretats al estabulari, amb les postes a punt de tècniques que afrontar-ho juntes ho feia millor. Gràcies per la teua amistat, ser-hi sempre disposada a ajudar amb qualsevol cosa, consells, cerveses i abraçades. Aquests anys compartits han sigut un gran plaer i estic orgullósíssima de ser la teua deixeble.

Gràcies a tothom amb qui he coincidit al llarg d'aquests anys al grup de Teràpia Gènica i Càncer. Al **Marc**, gràcies per ser l'ànima del laboratori, per ser tu i ser acollida. Per tenir un cor enorme, disposat a fer pastissos per a tothom, ajudar a nivell científic i ser el *tito Marc* dels meus ratolins, i a nivell personal tenir un cafè i una abraçada sempre quan l'he necessitada. A la **Sílvia**, per la teua ajuda amb tot i

per tots els moments dins i fora del laboratori, inclús compartint el nostre final. I gràcies per mantenir i saber transmetre sempre la teva mirada crítica, a la ciència i a la vida. A la **Sabri**, per tots els riures compartits dins i fora del laboratori, i com no, gràcies als teus memes i a les classes per deixar de ser *boomer*. Al **Francesc**, gràcies per ser-hi i donar-nos energia fresca i motivació científica, i tot acompanyat dels *Francesc Facts* que han anat omplint tots els nostres dinars, gelats i estones de cafès. A la **Marta**, per que has sigut la meva companya de resistència en dinars amb converses inverosímils, gràcies per ser-hi sempre disposada a ajudar!

I més enllà dels Fillat, gràcies a totes aquelles persones de la planta amb qui he compartit moments i converses, a la Gemma, als Melanoma, Manel Juan, Colomer i Guedán. En especial, a tots els que hem compartit aquest viatge del doctorat de manera conjunta, ja què amb cases rurals, calçotades, *escape rooms* i cervesetes tot es viu millor!

Gràcies a tota la gent de la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme, el meu origen i on tot va començar. A la **Toni**, gràcies per donar-me la oportunitat i confiar en mi per formar part del grup com a estudiant de màster, i iniciar-me en el món de la recerca científica. Gràcies per transmetre'm la passió i els coneixements que tens en aquest camp, ha sigut tot un plaer poder aprendre en un dels centres de referència en el coneixement de les metabòliques. Al **Frede**, gràcies per ser el cap i el cor del grup, per transmetre'ns les ganes i passió per la ciència ben feta, igual que ho feies amb la màgia del caga tió i dels esmorzars per a que el *Mito Team* agaféssim energia. A **Olatz**, gracias por tu apoyo y amistad, por ser un ejemplo a seguir, demostrando pasión y compromiso por el trabajo bien hecho. Gracias por todos los viajes y cervecitas compartidas, y abrirnos siempre la puerta a vuestra casa! Al **Gerard**, gràcies i mil gràcies per la teva amistat i per ser-hi sempre, dins i fora del laboratori. Com a científic ets brillant, dedicat, meticolós, i has acabat demostrant ser un crack en tot allò que t'has proposat. Ha sigut tot un honor veure-ho de prop i quedar-m'hi com a amiga, i compartir els bons i no tan bons moments amb gelats de divendres, vermutets, paelles, viatges, sortides a córrer i festetes.

Vull agrair també a l'equip d'especialistes de la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme, per què sempre m'heu mostrat la vostra disponibilitat, interès i ajuda en tot el que he necessitat. En especial, a la **Laura Gort**, gràcies per tants dinars

compartits, i encomanar-nos sempre el teu entusiasme. Per què de la teva mà vam publicar el meu primer article de primera autora, i el teu suport va ser incondicional. Un agraïment etern als tècnics de metabolisme intermediari, en especial, al **Carles**, a la **Patricia**, a la **Cristina Cutillas**, a la **Cristina Fernández** i al **Rubén**, els meus àngels de la guarda en els moments de crisi al IBC. Gràcies per ensenyar-me el món de l'espectrometria de masses, tenir sempre la voluntat d'ajudar-me en moments de crisi, i aconseguir que els imprevistos de les tècniques no poguessin amb mi; i sobretot, fer-ho tot amb un somriure. Gràcies per acollir-me al laboratori i fer-me partícip de la vostra alegria!

A l'**Asociación Familias GA**, en especial a l'Albert i la Montse, per ser sempre tant propers, i pel vostre coratge i implicació. Estic convençuda que tots els vostres esforços es veuran recompensats!

A totes les persones que conformen el consorci CHARLIE, i altres centres i grups amb qui he tingut la sort de compartir projectes, congressos, reunions CIBERER, cursos, sopars,...He après moltíssim de vosaltres, guardo molt bons records dels moments conviscuts, i és un honor que bona part de la bibliografia d'aquesta tesi sigui arrel de la vostra feina!

També voldria agrair a totes les persones que m'han acompanyat a nivell personal al llarg d'aquests anys:

A les de sempre, les **intrèpides** del meu cor, Maria, Sònia, Marta, Marina i Mariona. Gràcies per ser-hi sempre i ser una font inesgotable de felicitat i riures, us estimo. Per seguir tenint-nos tot i la distància, pels viatges que hem fet i per tots els que ens queden, pels sopars d'*un dia és un dia*, i per que amb els *painkillers* ens hem convertit en les millors terapeutes del món! A les de la **uni**, Andrea, Clara, Adri, Eli i Carlota. Gràcies per ser sempre les *companyes de la Laia* i per què maaaai ens hem deixat. Per què tot i que muntar un sopar o un viatge suposa una gimcana per a nosaltres, els retrobaments són com si el temps mai hagués passat!

A **Esquerdats**, el meu altre projecte d'aquesta vida *eixamplenca*. Per ser família, ser un repte personal i sobretot compartit, ser esforç, lluita i compromís, però també un gaudir i celebrar. Gràcies a totes de les que he après tantíssim, dia a dia, amb les petites coses de la gestió d'aquesta bogeria, i amb les que hem sigut tant i tant felices!

En especial, a les **nenitas** per que sou totes unes boues, gràcies per fer les coses tan fàcils i ser llum, entusiasme, motivació i sobretot, família. I a la **Paula**, per ser la millor il·lustradora, però sobretot amiga, i dissenyar aquesta portada preciosa, fent aquesta tesi una mica més especial!

A la **Clara** i l'**Helena**, gràcies per ser casa, per que juntes hem fet de pisos una llar, i mira que la decoració no és el nostre fort. Per tots els sopars compartits, tertúlies, riures, estones de sofà, excursions, fondues d'aniversari,... i per la bogeria de PD Candela. Per haver compartit tantíssims moments feliços, però també d'angoixes, inseguretats i nervis, en els que ens hem tingut sempre com a xarxa de suport. Per que *con las compañeras siempre* i amb vosaltres encara més. Què felices que hem sigut als nostres balconets!

Al **Pau**, gràcies per tot, per ser-hi, estimar-me i cuidar-me tantíssim, tot i la distància. Per fer de Copenhage també casa meva. Per accedir a aquesta bogeria, i agafar-nos fortíssim de la mà i acompanyar-me en aquest final de tesi de la manera més apassionant. Per fer les coses fàcils, i transmetre'm la teva llum, el teu entusiasme i la teva passió per la vida. Per donar-me sempre la millor mandarina, què afortunada em sento de tenir-te al meu costat!

A la **meva família**, gràcies a tots, per ser-hi sempre i ensenyar-me el plaer dels esmorzars en rotllaneta. Per que tot i que la meva agenda a vegades és un *sudoku*, no hi ha res millor que un berenar a casa els iaïos o l'àvia, o un diumenge al Bruc. En especial, al **Joan Carles**, gràcies per ser-hi sempre i ser l'ànima que aglutina a la família, per tants estius compartits en que vam ser tan feliços, però on també vam aprendre que *les bromes porten aigua*. Als **iaïos**, per ser exemple d'esforç i estima, i la seva voluntat de veure'ns créixer junts i d'estar-ne orgullosos. I a l'**àvia**, gràcies per la teva alegria radiant i l'entusiasme per la vida contagiós. Per fer-me saber lo orgullosa que estàs de mi, i de ben segur que el padrí també ho estaria!

Als **meus pares**, gràcies pel vostre amor incondicional, per cuidar-me i mimar-me tantíssim. Per inculcar-me valors, i ser referents d'esforç, dedicació i compromís per la feina ben feta. Per saber jugar a l'estira i arronsa amb el cordó umbilical, i ser-hi sempre, però també respectar les meves decisions. Gràcies per totes les oportunitats que m'heu donat a la vida que m'han fet ser qui soc ara. Us estimo!

Aquesta tesi s'ha pogut desenvolupar gràcies al consorci CHARLIE, un consorci internacional de recerca dirigit a la recerca d'errors innats del metabolisme de la lisina. Aquest, està finançat per l'Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) AC20/00088 en el marc del programa de recerca i innovació Horizon 2020 de la Unió Europea sota l'European Joint Programme on Rare Diseases (EJP RD) COFUND-EJP N° 825575. Els estudis han tingut suport del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), finançats pels projectes ER21P4AC716 i ER21PE01. CIBERER és una iniciativa de l'Instituto de Salud Carlos III (Ministeri de Ciència i Innovació).

Gran part de les figures d'aquesta tesi han estat creades utilitzant Biorender (<https://app.biorender.com/>).

ÍNDEX

ABREVIACIONS	15
PRESENTACIÓ.....	19
1. INTRODUCCIÓ.....	21
1.1. Malalties metabòliques hereditàries.....	23
1.2. Malalties del metabolisme de la lisina.....	27
1.2.1. Hiperlisinèmia	29
1.2.2. Epilèpsia dependent de piridoxina.....	30
1.2.3. Acidúria 2-aminoadípica i 2-oxoadípica.....	31
1.2.4. Acidúria glutàrica tipus 1	31
1.2.5. Acidúria glutàrica tipus 3	32
1.3. Acidúria glutàrica tipus 1.....	33
1.3.1. Etiologia	33
1.3.2. Mecanisme fisiopatològic.....	34
1.3.3. Presentació clínica	36
1.3.4. Diagnòstic.....	40
1.3.5. Tractament.....	41
1.3.6. Models experimentals	44
1.3.7. Perspectives terapèutiques	49
1.4. Teràpia gènica	51
1.4.1. Estratègies de silenciament genètic.....	52
1.4.2. Vectors virals adenoassociats.....	60
1.4.3. Transferència gènica al sistema nerviós central	67
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS	71
3. MATERIALS I MÈTODES.....	75
3.1. Manipulació del DNA.....	77
3.1.1. Aïllament de DNA	77
3.1.2. Quantificació del DNA.....	79
3.1.3. Amplificació del DNA	79
3.1.4. Tècniques de clonatge.....	82
3.1.5. Producció, purificació i titulació d'AAV	87
3.2. Manipulació del RNA	89

3.2.1.	Aïllament de RNA	89
3.2.2.	Quantificació de RNA	89
3.2.3.	Anàlisi de l'expressió del RNA missatger	89
3.2.4.	Anàlisi de l'expressió del microRNA	90
3.3.	Manipulació de proteïnes	93
3.3.1.	Western Blot SDS-PAGE.	93
3.3.2.	Assaig luciferasa	97
3.3.3.	Assaig luminescència - Activitat enzimàtica de l'AASS.....	97
3.4.	Tècniques de cultius cel·lulars	99
3.4.1.	Línies cel·lulars i condicions de cultiu.	99
3.4.2.	Transfeccions	99
3.5.	Tècniques de manipulació animal	101
3.5.1.	Administració <i>in vivo</i>	101
3.5.2.	Eutanàsia i obtenció de mostres.....	103
3.6.	Anàlisi bioquímiques.....	104
3.6.1.	Homogenats de teixits	104
3.6.2.	Quantificació d'àcids dicarboxílics, metabòlits clau de l'AG1	104
3.6.3.	Quantificació de la peroxidació lipídica.....	106
3.6.4.	Quantificació de paràmetres bioquímics en sèrum.....	106
3.7.	Anàlisi histològiques.....	107
3.7.1.	Obtenció i processament de mostra.....	107
3.7.2.	Tincions histològiques	107
3.8.	Recursos bioinformàtics	111
3.8.1.	Recursos informàtics relacionats amb els dissenys de miRNA	111
3.8.2.	Altres recursos bioinformàtics.....	111
3.9.	Anàlisis estadístiques i representació gràfica.....	112
4.	RESULTATS	113
4.1.	Disseny i identificació dels miRNA amb capacitat de silenciar l'AASS <i>in vitro</i>	115
4.1.1.	Disseny dels miRNA.....	115
4.1.2.	Validació de l'eficiència de miR_AASS <i>in vitro</i>	117
4.1.3.	Estudi de l'especificitat de miR_AASS <i>in vitro</i>	120
4.2.	Avaluació de la biodistribució del vector AAV_miR_AASS i l'eficiència del silenciament de l'AASS en ratolins <i>Gcdh</i> ^{-/-}	122

4.2.1.	Estudi de l'administració dels diferents AAV_miR_AASS a edat jove-adulta a dia 30 post-natal (P30)	124
4.2.2.	Estudi de l'administració de l'AAV9_miR_AASS a edat jove dia 15 post-natal (P15)	127
4.2.3.	Estudi de l'administració de l'AAV9_miR_AASS a edat neonatal (P1) per via intravenosa (IV).....	130
4.2.4.	Estudi a llarg termini de l'administració de l'AAV9_miR_AASS a edat neonatal (P1) per via intravenosa (IV).....	134
4.2.5.	Estudi de l'especificitat i efectes <i>off-target</i> de l'AAV9_miR_AASS <i>in vivo</i>	136
4.3.	Estudi de l'eficàcia terapèutica d'una administració neonatal del vector AAV9_miR_AASS en ratolins <i>Gcdh</i> ^{-/-} en un context d'exposició a dieta alta en lisina.....	138
4.3.1.	Impacte de l'exposició a dieta alta en lisina en l'expressió de l'AASS	139
4.3.2.	Anàlisi sobre l'acumulació de metabòlits.....	141
4.3.3.	Estudi sobre les alteracions neuropatològiques en el nucli estriat	144
4.3.4.	Determinació dels efectes en l'estrès oxidatiu.....	149
4.3.5.	Estudi sobre les alteracions hepàtiques	152
4.3.6.	Evolució del pes corporal i supervivència	157
5.	DISCUSSIÓ	159
5.1.	Disseny de la teràpia gènica.....	163
5.2.	Transducció i eficiència de silenciament als teixits diana.....	167
5.3.	Eficàcia terapèutica de l'AAV9_miR_AASS en el model murí d'AG1 quan s'administra per via intravenosa en l'etapa neonatal.....	172
5.4.	Perspectives de translació de la teràpia a la clínica.....	179
6.	CONCLUSIONS.....	181
7.	BIBLIOGRAFIA	185
8.	ANNEX.....	211
8.1.	Taules.....	213
8.2.	Articles	216

ABREVIACIONS

#	3-OHGA	Àcid 3-hidroxiglutàric
	8-oxodG	8-oxo-2'-desoxiguanosina
A	AA	Àcid alfa-aminoadípica
	AADAT	Alfa-aminoadipat aminotransferase
	AAP	Proteïna activadora de l'assemblatge
	AASA	Àcid 2-aminoadípica-6 semialdehid
	AASS	Alfa-aminoadípica semialdehid sintasa
	AAV	Virus adenoassociat
	AAVr	AAV recominant
	ACAA2	3-cetoacil-CoA tiolasa
	ACAT1	Acetoacetyl-CoA tiolasa
	Ad	Adenovirus
	AG1	Acidúria glutàrica tipus 1
	AG3	Acidúria glutàrica tipus 3
	Ago2	Argonaute 2
	ALDH7A1	Alfa-aminoadípica semialdehid deshidrogenasa
	ALP	Fosfatasa alcalina
	AMOXAD	Acidúria 2-aminoadípica i 2-oxoadípica
	AO	Àcid a-oxoadípica
	ASO	Oligonucleòtids antisentit
	ATQ	Antiquitina
B	BHE	Barrera hematoencefàlica
	bp	Parell de bases
	BSA	Albúmina sèrica bovina
C	C5DC	Glutarilcarnitina
	cDNA	DNA complementari
	CEA	Crisi encefalopàtica aguda
	CEEA	Comitè Ètic d'Experimentació Animal
	CM	Cisterna magna
	CMV	Citomegalovirus
	CoA	Coenzim A
	CRYM	L-cristal·lina/ketimina reductasa
	CSF	Líquid cefalorraquidi
D	DHTKD1	Subunitat E1 deshidrogenasa i domini de transcetolasa que conté la proteïna 1
	DNA	Àcid desoxiribonucleic
	dNTP	Desoxiribonucleòtid
	dsDNA	DNA de doble cadena
	dsRNA	RNA de doble cadena
	DTT	Ditiotreitol
E	ECSH1	Enoil-CoA hidratasa
	EDP	Epilèpsia dependent de la piridoxina

F	EMA	Agència Europea del Medicament
	Exp5	Exportina 5
	FAD	Dinucleòtid de flavina-adenina
	FBS	Sèrum fetal boví
	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	FLuc	Firefly luciferasa
	Fw	<i>Forward</i>
	GA	Àcid glutàric
	GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
	GCA	Àcid glutacònic
H	GCDH	Glutaril-CoA deshidrogenasa
	GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial
	gv	Genomes virals
	h	Hores
	H&E	Hematoxilina&Eosina
I	HADH	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
	HGMD	<i>Human gene mutations database</i>
	hiPSC	Cèl·lules mare humanes pluripotents induïdes
	HLD	Dieta alta en lisina
	HLD	Dieta alta en lisina
K	ICM	Intracisterna magna
	ICV	Intracerebroventricular
	IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
	IP	Intraprenquimal
	iPSC	Cèl·lules mare pluripotents induïdes
L	iRNA	RNA d'interferència
	IT	Intratecal
	ITR	Repetició terminal invertida
	IV	Intravenosa
	Kb	Kilobase
M	Kg	Kilogram
	KI	<i>Knock in</i>
	KO	<i>Knock out</i>
	LB	Medi <i>Luria-Bertani</i>
	LKR	Lisina-cetoglutarat reductasa
	LOVD	<i>Leiden OpenVariation database</i>
	Lys	Lisina
	M	Molar
	MAAP	Proteïna AAV associada a la membrana
	MBP	Proteïna bàsica de mielina
	MDA	Malondialdehid
	mg	Mil·ligram
	min	Minuts
	miRNA	microRNA

	mL	Mil·lilitre
	mm	Mil·límetre
	mM	Mil·límlar
	MMH	Malalties metabòliques hereditàries
	MMLV-RT	Transcriptasa inversa del virus de la leucèmia murina Moloney
	MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
	mRNA	RNA missatger
N	NeuN	Antigen nuclear neuronal
	NGS	Seqüenciació massiva o de nova generació
	nm	Nanòmetres
	nt	Nucleòtids
	°C	Grau Celsius
O	OGDH	Oxoglutarat deshidrogenasa
	ORFs	Marcadors oberts de lectura
P	p-value	Valor de probabilitat
	P1	Dia 1 post-natal
	P15	Dia 15 post-natal
	P30	Dia 30 post-natal
	P6C	$\Delta 1$ -piperideine 6-carboxílic
	PBS	Tampó fosfat salí
	PCGF3	Anular 3 del grup Polycomb
	PCN	Programes de cribratge neonatal
	PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
	PFA	Paraformaldehid
	PHYKPL	5-fosfohidroxi-L-lisina fosforilasa
	PIPOX	Àcid pipecòlic oxidasa
	PLP	Piridoxal 5'-fosfat
	poliA	Poliadenilació
Q	qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
R	RASSF4	Membre 4 de la família del domini d'associació Ras
	Rev	<i>Reverse</i>
	RISC	Complex d'inducció al silenciament del RNA
	RLuc	Renilla Luciferasa
	RNA	Àcid ribonucleic
	ROS	Espècies reactives d'oxigen
S	s	Segons
	SD	Dieta estàndard
	SDH	Sacaropina deshidrogenasa
	SDS	Sodi dodecil sulfat
	SEM	Error estàndard mig
	SFDA	<i>State Food and Drug Alimentation</i>
	shRNA	Forqueta curta de RNA
	siRNA	Seqüències petites d'interferència de RNA

T	SNC	Sistema nerviós central
	ssDNA	DNA de cadena única
	SUGCT	Succinil-CoA:glutarat-CoA transferasa
	TA	Temperatura ambient
	TBS	Solució salina tamponada amb Tris
	TBS-T	Solució salina tamponada amb Tris i Tween 20
	TCA	Àcid tricarboxílic
U	TEMED	Tetrametiletilendiamina
	U	Unitats enzimàtiques
	UPLC-MS/MS	Ultra cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem
V	VP	Proteïna viral
W	WT	<i>Wild-type</i>
	µg	micrograms
	µL	microlitres
	µM	micromolar

PRESENTACIÓ

L'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1) és una malaltia metabòlica hereditària causada per la deficiència enzimàtica de glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH), una proteïna implicada en el catabolisme de la lisina, el triptòfan i la hidroxilisina. La deficiència de GCDH, dona lloc a l'acumulació de glutaril-CoA i dels seus derivats dicarboxílics: l'àcid glutàric (GA) i el 3-hidroxi glutàric (3-OHGA). Aquests es concentren principalment al sistema nerviós central (SNC), provocant alteracions neurològiques associades a lesions irreversibles en la regió estriatal i trastorns del moviment, que acaben sent inhabilitants per als pacients. El debut clínic de la malaltia es dona principalment entre els 3 i 36 mesos d'edat, iniciant-se amb una crisi encefalopàtica aguda (CEA) que sorgeix d'un esdeveniment precipitant com ara un episodi de febre, infeccions o dejuni, entre d'altres.

Actualment, l'AG1 es pot detectar de forma precoç ja que es troba inclosa al Programa de Cribratge Neonatal (PCN) de molts països. Tanmateix, actualment no existeix cap tractament curatiu per a la malaltia. La única opció terapèutica és una dieta preventiva, basada principalment en una restricció dietètica de lisina i la suplementació amb carnitina, així com amb la prevenció del catabolisme en moments crítics. D'aquesta manera s'aconsegueix prevenir l'aparició del dany estriatal en dos terços dels pacients, però tot i mantenir una bona adherència a la dieta, encara hi ha un nombre significatiu de pacients que desenvolupen crisis encefalopàtiques, donant lloc a alteracions psicomotores greus i permanents. A més, una de les principals limitacions d'aquesta teràpia metabòlica és que la lisina no es pot restringir per complet de la dieta degut a que es tracta d'un aminoàcid essencial. S'evidencia així, la necessitat de desenvolupar noves teràpies eficaces per a l'AG1.

Aquesta tesi proposa l'exploració de la inhibició de la via del catabolisme de la lisina com a possible estratègia terapèutica per a l'AG1. Concretament, el silenciament de l'enzim 2-aminoadíplic semialdehid sintasa (AASS) com a teràpia de reducció de substrat amb l'objectiu de disminuir la generació, i consegüent, acumulació dels metabòlits neuro tòxics.

En un primer bloc experimental, s'ha desenvolupat l'estratègia de teràpia gènica basada en la inhibició de l'enzim AASS mitjançant un microRNA artificial (miRNA, per les seves sigles en anglès) dirigit al transcrit de l'AASS. La validació en línies cel·lulars humanes i murines ha permès seleccionar un miR_AASS amb eficiència i especificitat per al silenciament de l'AASS.

En un segon bloc, per tal d'avaluar *in vivo* el potencial terapèutic del miR_AASS encapsidat en un virus adenoassociat 9 (AAV9_miR_AASS), s'ha treballat amb ratolins *Gcdh*^{-/-} com a model animal de l'AG1. L'estudi de la utilització de diferents serotips d'AAV9, vies i períodes d'administració, ha demostrat que l'administració sistèmica de l'AAV9_miR_AASS en període neonatal, és aquella que permet induir de manera òptima el silenciament de l'AASS al nucli estriat, la principal estructura cerebral afectada a l'AG1. En estudis a un i sis mesos post-tractament, s'ha observat la reducció de l'expressió de proteïna AASS, i conseqüentment, un efecte terapèutic en la disminució de l'acumulació de metabòlits neuro tòxics en el nucli estriat i teixits perifèrics.

En condicions de sobrecàrrega de lisina, en les que s'indueix un fenotip sever en el model de ratolí AG1, l'administració intravenosa de l'AAV9_miR_AASS rescata l'acumulació de metabòlits neuro tòxics a la regió estriatal, fins als sis mesos post-tractament. Mentre que en aquestes condicions el model de ratolí AG1 mostra alteracions neuropatològiques que recapitulen el fenotip clínic humà, l'administració de l'AAV9_miR_AASS proporciona un efecte neuro protector enfront la lesió estriatal, fins a recuperar-ne la pèrdua de pes i la supervivència, compromesa per l'exposició a dieta alta en lisina.

Així doncs, els resultats d'aquesta tesi mostren que la inhibició del catabolisme de la lisina, en concret de l'AASS, a través de l'AAV9_miR_AASS prevé la inducció de les principals alteracions patològiques en ratolins *Gcdh*^{-/-}, suggerint el seu potencial terapèutic per a l'AG1.

1.INTRODUCCIÓ

1.1. Malalties metabòliques hereditàries

Les malalties metabòliques hereditàries (MMH) són un grup heterogeni de trastorns minoritaris d'origen genètic. Es caracteritzen per mutacions en gens que codifiquen per a proteïnes implicades en diverses funcions del metabolisme cel·lular, alterant el seu correcte funcionament i donant lloc a desequilibris en el metabolisme del organisme, causant manifestacions clíniques en l'individu (Ferreira & van Karnebeek 2019).

El concepte de malalties metabòliques hereditàries, o també anomenat errors congènits del metabolisme, va ser introduït per primera vegada per Sir Archibald Garrod l'any 1902 en els seus estudis sobre alcaptonúria (Garrod, 1902). Posteriorment, al 1909, descrivia l'observació de quatre entitats paradigmàtiques: albinisme, alcaptonúria, cistinúria i pentosúria; els pacients de les quals presentaven anomalies químiques que es transmetien familiarment seguint les lleis de Mendel (Garrod, 1909; Weatherall, 2008).

D'ençà a l'actualitat, el nombre de MMH descrites ha anat en augment, en especial degut a la irrupció de la seqüenciació massiva o de nova generació (NGS, per les seves sigles en anglès). Les MMH es diferencien d'altres malalties genètiques hereditàries, per tenir un fenotip metabòlic, és a dir un perfil alterat de metabòlits en fluids biològics, alteracions en el funcionament de diferent tipus de proteïnes, així com alteracions a nivell cel·lular, que permeten orientar-ne el diagnòstic (Saudubray & Garcia-Cazorla, 2018). No obstant això, tot i que l'existència d'un fenotip bioquímic va definir originàriament les MMH, l'aparició i la implementació del NGS ha donat lloc a la descripció d'un gran nombre de noves patologies que, tot i afectar les diferents vies metabòliques, no presenten alteracions bioquímiques identificables mitjançant les proves de diagnòstic convencionals. Conseqüentment, ha sorgit la necessitat d'una millor caracterització i classificació diferencial d'aquestes patologies.

Una recent classificació liderada per un consorci d'especialistes internacionals (ICIMD), ha permès classificar els 1.450 trastorns que s'han descrit fins ara en 24 categories, dividides en sis subcategories principals: deficiències del metabolisme intermediari, deficiències del metabolisme i transport lipídic, deficiències del

metabolisme dels compostos heterocíclics, deficiències del metabolisme de les molècules complexes i dels orgànuls, deficiències del metabolisme dels cofactors i els minerals i deficiències de la senyalització cel·lular metabòlica (Ferreira et al., 2021). Aquesta nova definició inclou qualsevol malaltia genètica primària per a la qual l'alteració d'una ruta bioquímica és intrínseca als seus trets bioquímics, clínics i/o fisiopatològics específics, independentment de l'existència o no d'alteracions bioquímiques detectables mitjançant les proves de diagnòstic disponibles actualment. En aquest sentit, cal tenir present que l'evolució de les tecnologies òmiques, especialment de la metabolòmica, ha permès descobrir retrospectivament biomarcadors específics per a algunes malalties, el que ha permès incrementar el coneixement de la seva fisiopatologia, així com establir mètodes per al seu diagnòstic.

Les MMH presenten una herència monogènica mendeliana, generalment autosòmica recessiva, tot i que també existeixen casos d'herència autosòmica dominant o d'herència lligat al cromosoma X. Tanmateix, existeixen malalties causades per alteracions al DNA mitocondrial que són heretades per via materna. Aquestes malalties tenen una prevalença global aproximada de 1/800 a 1/2500 naixements, mentre que la prevalença individual de cada una de les MMH oscil·la entre 1-10 de cada 100.000 nascuts vius, considerant-se així malalties minoritàries (Ferreira & van Karnebeek 2019).

Les MMH presenten un ampli ventall de manifestacions clíniques que poden implicar qualsevol òrgan o sistema, i que varien segons el tipus de trastorn i la gravetat de la mutació. Alguns símptomes freqüents inclouen retard del desenvolupament, discapacitat intel·lectual, trastorns del comportament, convulsions, acidosi metabòlica, malaltia hepàtica i muscular, així com alteracions del sistema nerviós, entre altres. Que en últim terme, poden provocar una reducció important de la qualitat de vida dels individus afectes fins a conduir a una mort prematura.

L'edat d'aparició i la severitat clínica de les MMH varien significativament d'una entitat a una altra, de manera que es poden trobar des de formes extremadament greus, incloent presentacions prenatales, fins a formes més lleus de presentació

adulta, i fins i tot algunes deficiències asimptomàtiques. Tanmateix, en el 80% dels casos el debut es dona en edat pediàtrica.

El tractament de les MMH depèn de cada entitat o grup de patologies. Encara que no existeix una cura per a moltes d'aquestes, algunes disposen de teràpies pal·liatives que ajuden a millorar els símptomes i la qualitat de vida dels pacients. En alguns casos, els tractaments disponibles poden millorar dràsticament el curs natural de la malaltia i l'evolució clínica dels pacients. El principal objectiu dels tractaments per a MMH és el de revertir les alteracions bioquímiques provocades pel defecte metabòlic primari. L'enfocament de les diferents estratègies terapèutiques té un espectre molt ampli: des de la modulació dietètica, suplementació de productes i/o cofactors enzimàtics, fins a teràpia de reemplaçament enzimàtic, teràpia cel·lular i gènica (Ginocchio & Brunetti-Pierri 2016).

El diagnòstic de les MMH pot ser complex degut a la gran heterogeneïtat genètica i clínica que presenten aquestes entitats. Davant de la sospita clínica d'una MMH, el diagnòstic clàssic s'inicia amb l'anàlisi de metabòlits o la mesura d'activitats enzimàtiques en fluids biològics, cèl·lules o cultius cel·lulars derivats de biòpsia de pell o d'altres mostres de teixit. Posteriorment, es realitzen estudis genètics dirigits al gen o gens associats al fenotip bioquímic detectat per tal d'assolir el diagnòstic definitiu. Tanmateix, aquest protocol de diagnòstic no sempre és efectiu, ja sigui perquè una determinada MMH no disposa de biomarcadors específics, o perquè el nombre de proves a realitzar o el nombre de gens candidats a estudiar és molt elevat, el que fa que l'estudi genètic es realitzi inicialment. Així mateix, també es poden realitzar estudis prenatals, tot i que per a unes poques MMH es poden realitzar proves bioquímiques en líquid amniòtic o vellositats per al diagnòstic prenatal, la gran majoria requereixen estudis genètics per a aquesta finalitat.

Per a moltes MMH amb tractament o intervenció clínica disponible, l'obtenció d'un diagnòstic ràpid i precís és essencial per evitar seqüeles irreversibles. Per aquest motiu, ja des de la dècada dels anys 60, es van implementar els primers programes de cribratge neonatal (PCN) bioquímic per a la detecció precoç d'algunes d'aquestes malalties amb tractament disponible (Woolf & Adams, 2020). Aquests programes han evolucionat al llarg del temps, incorporant progressivament un nombre creixent

de malalties, i reduint-ne la morbiditat i la mortalitat d'aquestes (Vernon, 2015). No obstant això, el nombre de malalties incloses és limitat, i actualment només es criben unes 60 entitats, les quals presenten algun biomarcador bioquímic o molecular que es pot detectar de manera senzilla i eficient (la Marca et al., 2023; Loeber et al., 2021).

1.2. Malalties del metabolisme de la lisina

Les malalties del metabolisme de la lisina són MMH causades per defectes enzimàtics en la via del catabolisme de la lisina. Aquest, és un aminoàcid essencial per als humans, que no es pot sintetitzar de manera endògena, i per tant, s'ha de consumir en quantitats adequades en la dieta, per tal de poder mantenir una síntesi òptima de proteïnes (Matthews, 2020).

La degradació de la lisina es duu a terme mitjançant dues vies: la via de la sacaropina i la de l'àcid pipecòlic. La via de la sacaropina és considerada la principal via de degradació, la qual consta de nou reaccions enzimàtiques que tenen lloc a la mitocondria. Pel que fa la via de l'àcid pipecòlic, és la via alternativa de degradació i a nivell molecular està poc caracteritzada, consta de cinc reaccions localitzades en diferents compartiments cel·lulars. Les dues vies de degradació són independents i convergeixen en el tercer pas de la degradació de la lisina per la via de sacaropina. A més, la hidroxilisina i el triptòfan també s'incorporen a la mateixa via metabòlica seqüencialment, produint metabòlits posteriors (Figura 1.1) (Bouchereau & Schiff 2020; Chang 2023).

Fins aquests darrers anys, s'havia considerat la via de sacaropina com aquella utilitzada majoritàriament en els teixits extracerebrals, mentre que la via de l'àcid pipecòlic es considerava que es duia a terme principal en cervell. Tanmateix, estudis recents han demostrat que la ruta principal del catabolisme de la lisina en cervell continua sent la via de sacaropina a través de l'enzim bifuncional, l'alfa-aminoadípica semialdehid sintasa (AASS) (Bouchereau & Schiff 2020; Crowther et al. 2019; Pena et al. 2017).

La via de la degradació de la lisina és clínicament rellevant a causa de la presència de dues MMH amb trastorns neurometabòlics greus: l'epilèpsia dependent de la piridoxina (EDP) i l'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1), sent aquesta última la malaltia objecte d'aquesta tesi. A més, també hi ha l'existència de tres trastorns que afecten a la degradació de la lisina sense conseqüències clíniques greus, sent la majoria dels pacients asimptomàtics, aquests són la hiperlisinèmia, l'acidúria 2-aminoadípica i 2-oxoadípica (AMOXAD) i l'acidúria glutàrica tipus 3 (AG3). Cal destacar, que totes

elles tenen un patró d'herència autosòmic recessiu (Chang, 2023; Leandro & Houten, 2020).

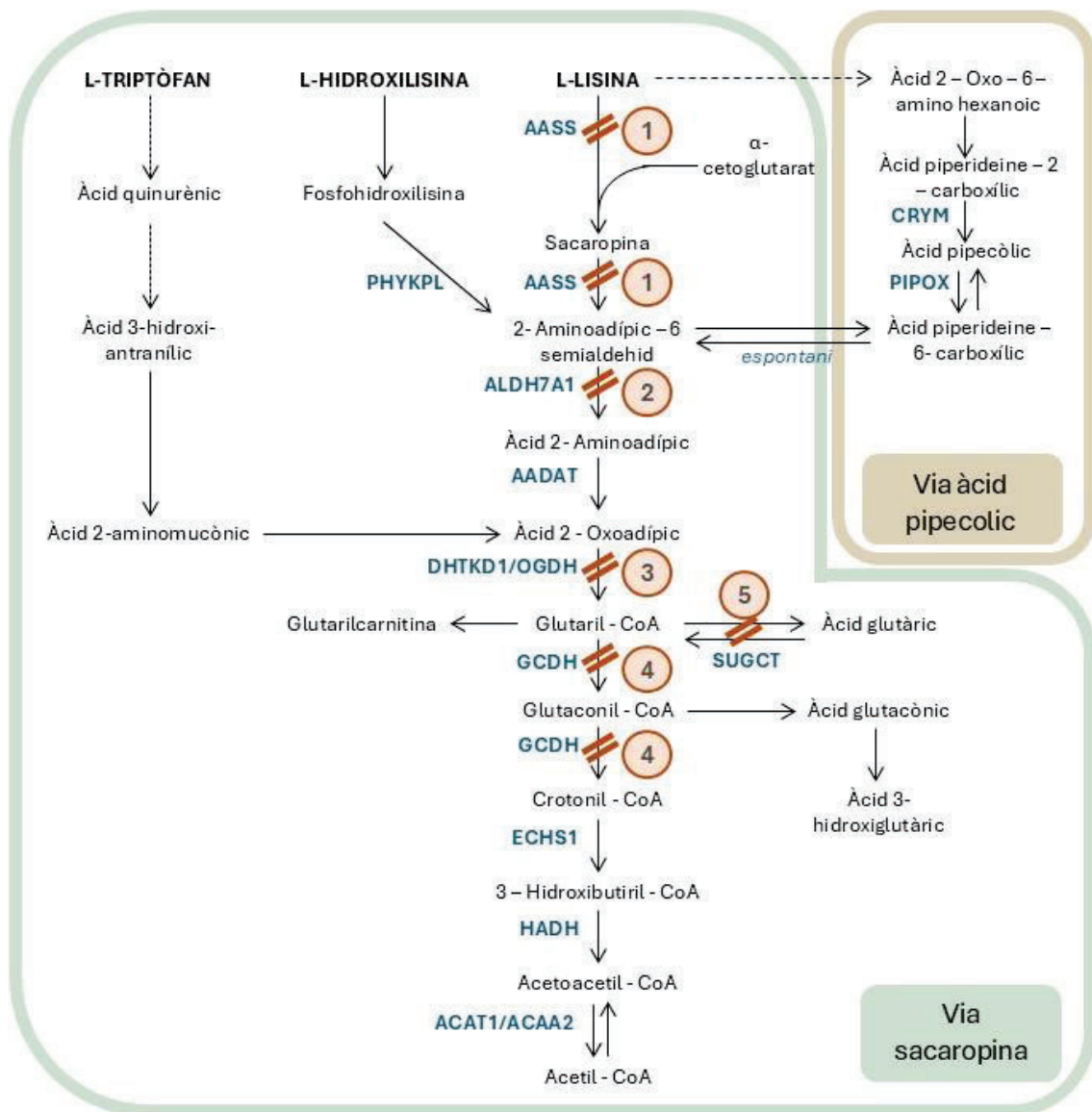


Figura 1.1. Representació esquemàtica de les vies del catabolisme de la lisina, el triptòfan i la hidroxilisina i dels trastorns que es deriven del bloqueig de la via degut als defectes enzimàtics. La lisina es degrada mitjançant la via sacaropina o la via de l'àcid pìpecolic. En blau: principals enzims que prenen part de la via del catabolisme de la lisina. Abreviatures: AASS, alfa-aminoaldipic semialdehid sintasa; ALDH7A1, alfa-aminoaldipic semialdehid deshidrogenasa; AADAT, alfa-aminoaldipat aminotransferase; DHTKD1, subunitat E1 deshidrogenasa i domini de transcetolasa que conté la proteïna 1; OGDH, oxoglutarat deshidrogenasa; GCDH, glutaril-CoA deshidrogenasa; SUGCT, succinil-CoA:glutarat-CoA transferasa; ECHS1, enoil-CoA hidratasa; HADH, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; ACAT1, acetoacetyl-CoA tiolasa; ACAA2, 3-cetoacil-CoA tiolasa; CRYM, l-cristal·lina/ketimina reductasa; PIPOX, àcid pìpecolic oxidasa; PHYKPL, 5-fosfohidroxil-L-lisina fosforilasa. En números: trastorns derivats del bloqueig enzimàtic de la via de degradació de la lisina. 1: hiperlisinèmia, 2: epilèpsia depenent de piridoxina, 3: acidúria 2-aminoaldípica i 2-oxoaldípica, 4: acidúria glutàrica tipus 1, 5: acidúria glutàrica tipus 3. Figura adaptada de Bouchereau & Schiff, 2020; Chang, 2023; Leandro & Houten, 2020.

1.2.1. Hiperlisinèmia

La hiperlisinèmia (MIM #238700) és una MMH causada per defectes enzimàtics a l'alfa-aminoadípíic semialdehid sintasa (AASS), un enzim mitocondrial que realitza el primer pas de la degradació de la lisina. Es caracteritza bioquímicament per mostrar nivells elevats de lisina en fluids biològics (Houten et al., 2013).

L'AASS és un enzim bifuncional format per dos dominis: el lisina-cetoglutarat reductasa (LKR) i el sacaropina deshidrogenasa (SDH), ambdós codificats pel mateix gen l'AASS. Quan les mutacions genètiques afecten a l'activitat del domini LKR de l'AASS es dona hiperlisinèmia tipus I, conduint a l'acumulació de la lisina. Per contra, si les mutacions afecten al domini SDH, aquestes provoquen hiperlisinèmia tipus II, també coneguda com a sacaropinúria, i es genera l'acumulació de lisina i sacaropina (Leandro & Houten 2020).

És interessant destacar que la hiperlisinèmia tipus I es considera una entitat benigna, és a dir té fenotip bioquímic, però no té significació clínica. Les conseqüències clíniques de la hiperlisinèmia tipus II s'han relacionat amb un retard del desenvolupament i discapacitat intel·lectual, tot i que l'escassetat de casos diagnosticats i el fet que els individus descrits presentin un context genòmic amb altres alteracions, fan que la simptomatologia d'aquesta malaltia segueixi sent qüestionable (S. M. Houten et al., 2013; Marinella et al., 2024). Tanmateix, estudis en models ratolí han descrit que ratolins amb mutacions a LKR no tenen fenotip clínic detectable, mentre que ratolins mutants SDH mostren danys mitocondrials, deteriorament funcional al fetge, i un desenvolupament neuronal alterat. Suggerint que l'acumulació de sacaropina, però no de lisina, és la responsable de l'aparició del fenotip clínic en hiperlisinèmia tipus II (Guo et al., 2022a; Zhou et al., 2019).

Arran d'aquests descobriments, el domini LKR de l'AASS s'ha posicionat com a possible diana terapèutica per a estudis de teràpies de reducció de substrat per a MMH amb defectes a la via de degradació de la lisina (Leandro & Houten, 2020). Estudis recents han demostrat que en models ratolí d'AG1, la supressió de l'Aass mitjançant la generació de models *Gcdh*^{-/-}/*Aass*^{-/-}, condueix a la disminució dels nivells de metabòlits acumulats en orina, fetge i cervell. Indicant que la inhibició farmacològica de l'AASS limita l'acumulació de substrats acumulats pel defecte

enzimàtic que té lloc en l'AG1, i posicionant aquesta estratègia com a via prometedora per tractar l'AG1 i l'EDP (Barzi et al., 2023; Leandro et al., 2020).

1.2.2. Epilèpsia dependent de piridoxina

L'epilèpsia dependent de piridoxina (EDP; MIM #266100) és una MMH causada per el defecte enzimàtic a l'alfa-aminoadípíic semialdehid deshidrogenasa (AASA), altrament conegut com antiquitina (ATQ), proteïna codificada pel gen *ALDH7A1*. Mutacions en aquest gen donen lloc a l'acumulació del substrat àcid 2-aminoadípíic-6 semialdehid (AASA) i de la seva forma cíclica Δ 1-piperideïne 6-carboxílic (P6C) en fluids biològics. Els dipòsits d'aquests metabòlits condueixen a la inactivació per condensació del piridoxal 5'-fosfat (PLP). Aquest fet impossibilita la formació de la seva forma activa coneguda com a piridoxina o vitamina B6, sent aquest un coenzim essencial (Mills et al. 2006).

L'EDP és considerada una malaltia minoritària, la seva incidència global oscil·la entre 1:65.000 i 1:250.000 naixements. Es presenta clínicament com una encefalopatia epilèptica amb un debut neonatal caracteritzada per la presència de convulsions que es poden controlar amb dosis farmacològiques de piridoxina. Malgrat el control adequat d'aquestes, l'espectre fenotípic de l'EDP és ampli, incloent una infinitat d'epilèpsies neurològiques que provoquen retard en el desenvolupament i discapacitat intel·lectual en el 75% d'individus (Coughlin et al. 2019; van Karnebeek et al. 2016).

Actualment, el tractament terapèutic disponible és l'anomenat triple tractament, que es basa per una banda, en la suplementació amb piridoxina per tal de controlar les convulsions. I per altra banda, la suplementació dietètica amb arginina i la restricció de lisina, per tal de limitar l'entrada de la lisina a la via de degradació de sacaropina. Aquesta aproximació ha mostrat resultats prometedors, tot i que la teràpia no és capaç de revertir certes lesions precoces, suggerint la necessitat d'un diagnòstic i tractament precoç per tal de millorar el deteriorament cognitiu de l'EDP (Coughlin et al., 2021, 2015).

1.2.3. Acidúria 2-aminoadípica i 2-oxoadípica

L'acidúria 2-aminoadípica i 2-oxoadípica (AMOXAD; MIM #204750) és una MMH causada per el defecte enzimàtic a la subunitat E1 deshidrogenasa i domini de transcetolasa que conté la proteïna 1 (DHTKD1), isoforma de la oxoglutarat deshidrogenasa (OGDH), codificada pel gen *DHTKD1*. Mutacions en aquest gen provoquen alteracions a la via de la degradació de la lisina, hidroxilisina i el triptòfan, que es caracteritzen bioquímicament per l'acumulació de l'àcid alfa-oxoadípic (AO) i l'àcid alfa-aminoadípic (AA) (Danhauser et al., 2012).

Al llarg de la història, s'han identificat una vintena de casos que han mostrat un espectre molt ampli de presentacions clíniques, que inclouen des de subjectes asimptomàtics, a fenotips neurològics lleus o discapacitat intel·lectual severa. Aquesta heterogeneïtat posa de manifest la necessitat de futures investigacions per tal d'entendre la variabilitat fenotípica, així com els mecanismes pels quals DHTKD1 contribueix a la neuropatologia de l'AMOXAD (Przyrembel et al., 1975; Stiles et al., 2016).

El fet que la deficiència de DHTKD1 provoqui un fenotip clínic nul o lleu en humans, ha donat a lloc a que es plantegi la possibilitat d'utilitzar aquest enzim com a diana terapèutica d'inhibició farmacològica per a pacients amb AG1. Tenint en compte que DHTKD1 és l'enzim de la via de degradació de la lisina que se situa al pas previ del defecte enzimàtic de l'AG1. Biagosch i col·laboradors han explorat aquesta estratègia per tal de reduir l'acumulació de metabòlits dicarboxílics neurotòxics en individus amb AG1. Malgrat això, els resultats en models murins d'AG1 han suggerit que la inhibició farmacològica de *Dhtkd1* no és suficient per prevenir la manifestació clínica en el cervell del model d'AG1 (Biagosch et al. 2017).

1.2.4. Acidúria glutàrica tipus 1

L'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1; MIM #231670) és una MMH causada pel defecte enzimàtic a la glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH), codificada pel gen *GCDH*. Mutacions en aquest gen provoquen alteracions a la via de la degradació de la lisina, hidroxilisina i el triptòfan.

L'AG1 es caracteritza bioquímicament per l'acumulació de glutaril-CoA, i els seus derivats dicarboxílics àcid glutàric (GA) i àcid 3-hidroxiglutàric (3-OHGA), metabòlits tòxics que s'acumulen principalment al sistema nerviós central i es poden detectar en fluids biològics, en especial en orina. Tanmateix, es pot detectar per el diagnòstic un augment de glutarilcarnitina (C5DC) en fluids biològics, conjugat format per reduir l'acumulació de GA amb la finalitat de desintoxicar. Aquesta malaltia és l'objecte d'aquest treball de tesi i es detalla la seva descripció en l'*apartat 1.3*.

1.2.5. Acidúria glutàrica tipus 3

L'acidúria glutàrica tipus 3 (AG3; MIM #231690) és una MMH causada per defectes enzimàtics a succinil-CoA:glutarat-CoA transferasa (SUGCT), proteïna codificada pel gen *Sugct* (*C7orf10*). Tot i que SUGCT no forma part del via canònica de degradació de la lisina, aquest enzim catalitza la conversió de glutaril-CoA a GA, i viceversa. A nivell bioquímic, els pacients amb AG3 mostren un augment dels valors plasmàtics i d'orina de GA, però en contrast amb els pacients amb AG1 no tenen acumulació de 3-OHGA i C5DC (Sherman et al. 2008).

La significança clínica del trastorn és qüestionable, degut a l'ampli espectre de manifestacions que inclouen des de casos asimptomàtics fins a retard en el desenvolupament, convulsions i alteracions gastrointestinals. El fet que només s'hagin descrit una vintena de casos, sumat a la heterogeneïtat del símptomes clínics i que alguns individus descrits presentin un context genòmic amb altres alteracions, ha posat en dubte la relació entre el diagnòstic bioquímic i l'efecte causal de la malaltia (Dorum et al. 2020; Knerr et al. 2002; Waters et al. 2018).

1.3. Acidúria glutàrica tipus 1

L'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1; MIM #231670) és una MMH causada per defectes enzimàtics en la via de la degradació de la lisina, hidroxilisina i triptòfan. Està causada per mutacions en el gen *GCGH* que codifica per a la proteïna glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH).

Des de la seva primera descripció l'any 1975 feta per Goodman i col·laboradors, s'han descrit a la literatura més de 600 casos d'individus afectes (Boy et al., 2021a; Goodman et al., 1975). És considerada una malaltia minoritària degut a la seva baixa incidència global, que és d'1 cas cada 100.000 nounats (Boy et al., 2018; Kölker et al., 2007; Therrell et al., 2014). A més, s'han reportat freqüències de major incidència, de fins a 1:250, en certes poblacions concretes com: la comunitat Amish al comtat de Lancaster (Pennsilvània, Estats Units), les Primeres Nacions Ojibwe-Cree (Manitoba i Ontario, Canadà), els viatgers irlandesos (República de Irlanda), els Americans Nadius Lumbee (Carolina del Nord, Estats Units) i els Xhosa i altres subgrups de la població sud-africana (Sud-Àfrica) (Basinger et al., 2006; Haworth et al., 1991; Morton et al., 1991; Naughten et al., 2004; van der Watt et al., 2010).

1.3.1. Etiologia

L'AG1 és una malaltia de causa genètica d'herència autosòmica recessiva, provocada per la presència de variants patogèniques bial·lèliques en *GCDH*. Aquest gen està situat al cromosoma 19p13.13, comprèn fins a 7 kb i consta de 12 exons (Strauss, Puffenberger, Robinson, & Morton, 2003).

Fins a la data, s'han descrit aproximadament 240 variants patogèniques en *GCDH* en les diferents bases de dades *HumanGene* (HGMD; www.hgmd.cf.ac.uk), *Leiden OpenVariation* (LOVD; www.lovd.nl) i *ClinVar* (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) (Schuermans et al., 2023). El 80% de les variants patogèniques són mutacions puntuals amb canvi de sentit (*missense*), no obstant això també s'han descrit mutacions d'error de pauta de lectura, variants intròniques i delecions (Begley et al., 2011; Bross et al., 2012; Goodman et al., 1998).

De les mutacions *missense*, cal destacar que en poblacions caucàsiques, s'ha reportat la presència d'una variant patogènica amb una freqüència del 40%, aquesta és la

p.Arg402Trp (c.1204C>T), la qual provoca la pèrdua per complet de la funció enzimàtica de GCDH (Baric et al., 1999; Christensen et al., 2004). La majoria d'aquestes mutacions *missense* es consideren mutacions conformacionals, que condueixen a un plegament defectuós de la proteïna, provocant una disminució de la funció enzimàtica de la GCDH a causa de la pèrdua d'estabilitat de la proteïna o la impossibilitat de formar complexos homo- i heteromèrics (Keyser et al., 2008). Així doncs, la pèrdua parcial o per complet de l'activitat enzimàtica de la GCDH és la responsable del desequilibri metabòlic en l'AG1 (Schuurmans et al. 2023).

En paral·lel, també s'han reportat variants patogèniques d'alta prevalença en petits comunitats aïllades, incloses les poblacions descrites amb major freqüència d'AG1.

1.3.2. Mecanisme fisiopatològic

La GCDH és una proteïna situada a la matriu mitocondrial, que per tal de ser funcional necessita formar un complex homotetramèric conformat per 4 subunitats de proteïnes GCDH madures. Cada subunitat prové d'una proteïna GCDH precursora, de la qual se n'ha escindit una seqüència N-terminal de 44 aminoàcids, que és el pèptid senyal necessari per poder-se importar a la mitocòndria. A més, cada subunitat conté una molècula del dinucleòtid de flavina-adenina (FAD), cofactor d'aquesta proteïna i essencial per la transferència d'electrons (Goodman et al. 1995).

La proteïna GCDH és un enzim multifuncional de la via de degradació de la lisina, hidroxilisina i triptòfan, que es troba catalitzant la deshidrogenació oxidativa del glutaril-CoA i la conseqüent descarboxilació de glutaconil-CoA produint crotonil-CoA. Després de tres passos enzimàtics es forma acetil-CoA, que entra al cicle de Krebs com a pas final del catabolisme de la via sent necessari per la producció d'energia (Figura 1.1) (Christensen et al., 1993). Així doncs, la deficiència de la GCDH pot dependre d'un defecte en la reacció d'oxidació o bé de descarboxilació (Figura 1.2) (Hyman & Tanaka 1984).

La deficiència de GCDH dona lloc a l'acumulació de glutaril-CoA i els seu derivats dicarboxílics: l'àcid glutàric (GA) i l'àcid 3-hidroxiglutàric (3-OHGA), i en menor mesura també s'acumula l'àcid glutacònic (GCA). Com a conseqüència de l'acumulació del glutaril-CoA, aquest es conjuga amb la carnitina lliure per formar la

glutarilcarnitina (C5DC) que té la capacitat de creuar la barrera hematoencefàlica (BHE) i les membranes cel·lulars, contribuint en la desintoxicació de l'acumulació de GA. Per contra, els metabòlits dicarboxílics (GA i 3-OHGA) s'acumulen principalment al sistema nerviós central (SNC), degut a la manca de transportadors cerebrovasculars i a la baixa permeabilitat de la BHE (Larson & Goodman, 2019), sent metabòlits neurotòxics. Tots aquests metabòlits (Figura 1.2) es poden detectar en fluids corporals i en teixits el que permet el seu diagnòstic.

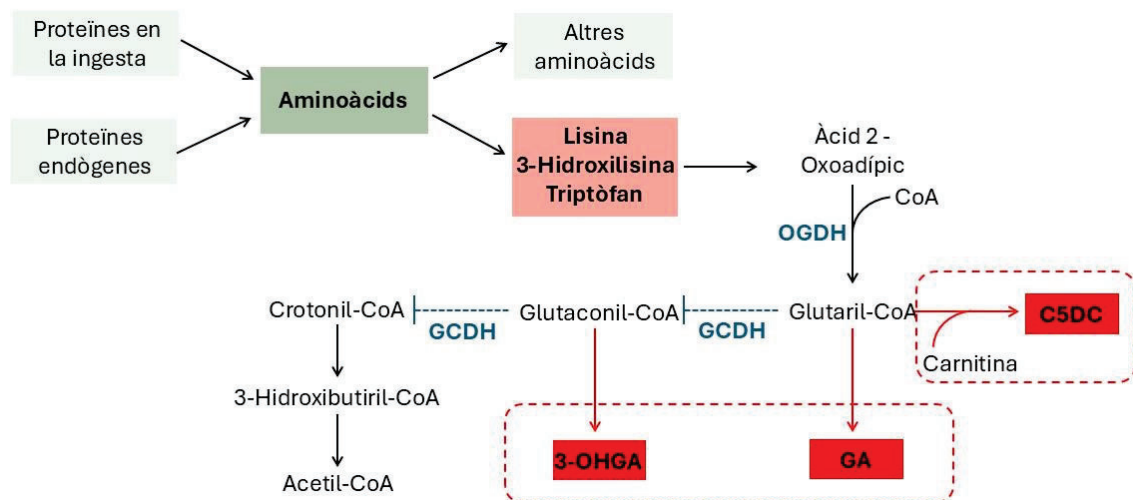


Figura 1.2. Representació esquemàtica de la via del catabolisme de la lisina, el triptòfan i la hidroxilisina en un context de deficiència de glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH). Els aminoàcids entren a les cèl·lules mitjançant diferents transportadors independents del sodi. Aquests aminoàcids es converteixen en àcid 2-oxoadípic (AO) al citosol mitjançant la transaminació acoblada al glutamat/cetoglutarat i es transporten a les mitocòndries. Posteriorment, el AO es descarboxila sota la catàlisi del oxoglutarat deshidrogenasa (OGDH). S'utilitza coenzim A (CoA) lliure per formar glutaril-CoA, que pot patir una conjugació amb carnitina per formar glutarilcarnitina (C5DC). La glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH) catalitza la conversió de glutaril-CoA a crotonil-CoA en una reacció de dos passos, primer de deshidrogenació a glutaconil-CoA i, segon, de descarboxilació a crotonil-CoA. Un enzim GCDH deficient no pot metabolitzar el glutaril-CoA a crotonil-CoA, donant lloc a l'acumulació d'àcid glutàric (GA), glutaril-CoA i l'àcid 3-hidroxiglutaric (3-OHGA), que actuen com a neurotoxines endògenes. A la vegada, l'increment del GA fa que es conjugui amb la carnitina i augmenti també la concentració de C5DC en fluids biològics. Figura adaptada de Li et al., 2021

L'acumulació de GA i 3-OHGA és la clau del mecanisme fisiopatològic que permet explicar la neuropatologia en pacients AG1. En models *in vivo* i pacients d'AG1, s'ha descrit que la neurotoxicitat causada per l'acumulació dels metabòlits dicarboxílics es dona especialment a la regió estriatal, sent aquesta l'estructura del cervell més susceptible i amb major exposició crònica i aguda dels metabòlits (Guerreiro et al., 2018; Latini et al., 2007; Seminotti et al., 2013). Els dipòsits de GA i 3-OHGA contribueixen en el dany neurològic, degut a una producció excessiva d'espècies

reactives d'oxigen (ROS) que interfereixen en el metabolisme energètic cerebral. A més, GA i 3-OHGA comparteixen similituds estructurals amb el glutamat (principal aminoàcid excitador), fet que permet que aquests metabòlits modulin la neurotransmissió glutamatèrgica i GABAèrgica, donant lloc a un desequilibri de la neurotransmissió excitatòria i inhibidora (Kölker et al., 2004). Provocant globalment un dany neuronal causat per excitotoxicitat, deteriorament del metabolisme energètic i estrès oxidatiu (Jafari et al. 2011; Wajner et al. 2019).

Tot i que els mecanismes cel·lulars que condueixen al dany neuronal a l'AG1 encara no estan del tot clars. Fins a la data, s'ha considerat que les lesions cerebrals tenen una major afectació en cèl·lules de tipus neuronal, degut a una major vulnerabilitat al dany per l'acumulació d'aquests metabòlits tòxics (Olivera-Bravo et al., 2015). Estudis en teixits i cèl·lules derivades de models de ratolí i rata, han descrit la pèrdua neuronal i formació de vacuoles al nucli estriatal, alteracions en substància blanca, la interrupció de la mielinització i un augment de la gliosi. La gliosi reactiva, és un mecanisme adaptatiu que es dona en cèl·lules de la glia, astròcits i micròglia, a mode de resposta a danys en el SNC (Koeller et al., 2002; Wajner et al., 2019; Zinnanti et al., 2007). En conjunt, les alteracions cerebrals extenses al nucli estriatal resulten en un trastorn del moviment irreversible, i un dany cortical progressiu que evoluciona cap a leucodistrofia (Boy et al. 2023).

1.3.3. Presentació clínica

L'AG1 és considerada una acidúria orgànica cerebral degut al seu fenotip neurològic predominant (Boy et al., 2023). Les característiques clíniques típiques de l'AG1 parteixen d'un debut clínic majoritàriament entre els 3 i 36 mesos arran d'una crisi encefalopàtica aguda (CEA) que es pot produir després d'un esdeveniment precipitant, com ara febre, gastroenteritis o dejuni, o com a conseqüència d'una vacunació o una intervenció quirúrgica. Aquestes crisis donen lloc a una lesió estriatal bilateral aguda irreversible, i posteriors trastorns complexos del moviment. Altres símptomes presents en l'ampli espectre clínic son hipotonia i letargia (Strauss et al., 2020). Els pacients també poden desenvolupar una lesió dels ganglis basals d'inici insidiós en absència d'una CEA identificada (Larson & Goodman 2019).

Més enllà de la simptomatologia neurològica, també s'han observat altres manifestacions clíniques extraestriatals independents del període de debut inicial de l'AG1, com l'hepatomegàlia i trastorns cardiorespiratoris (Vaidyanathan et al., 2011). També s'ha descrit la presència d'insuficiència renal crònica en pacients adolescents i adults d'AG1 (du Moulin et al., 2018; Stefan Kölker et al., 2015). Aquesta troballa en pacients amb AG1 s'ha recolzat amb estudis en models animals d'AG1, en els quals s'han observat alteracions en transportadors de GA i 3-OHGA de les cèl·lules renals del túbul proximal, confirmant l'existència de danys renals aguts i crònics (Gonzalez Melo et al., 2021a; Thies et al., 2013).

Tanmateix, les manifestacions clíniques de l'AG1 poden tenir un espectre i severitat molt àmplia depenent del diagnòstic precoç, el grau d'adherència a les mesures terapèutiques i el període de debut de la primera CEA (Figura 1.3).

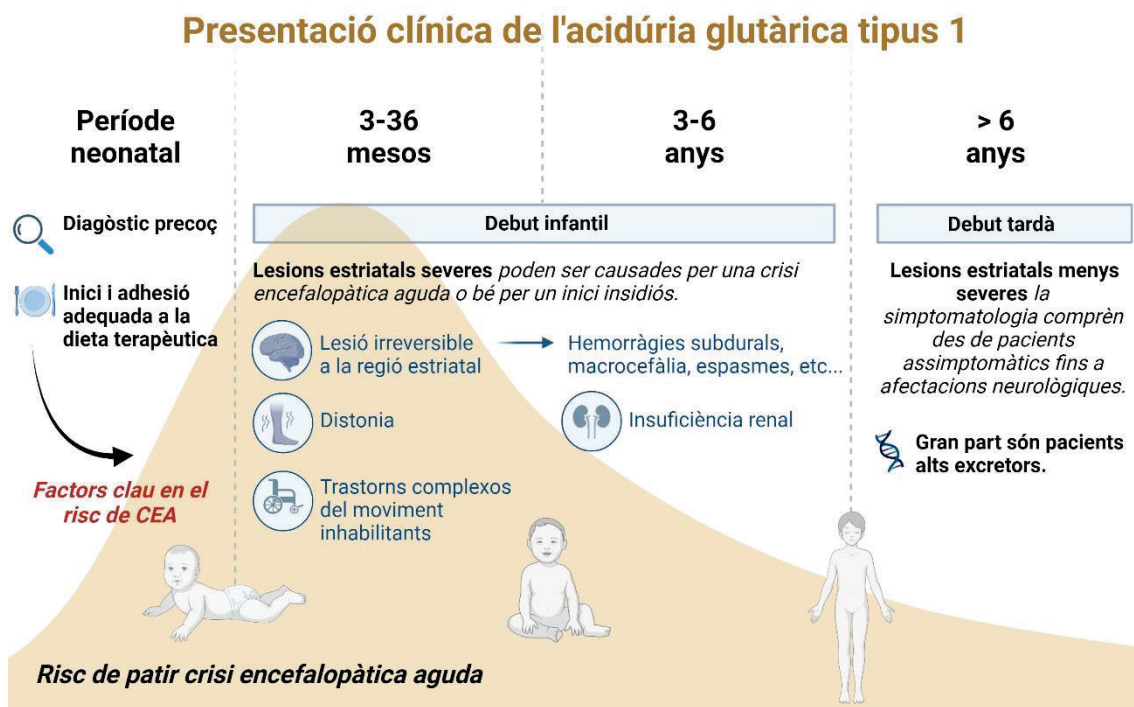


Figura 1.3. Presentació clínica de l'AG1 i factors que influeixen en l'evolució de la simptomatologia. Els individus afectes d'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1) poden presentar un ventall i severitat clínic ampli depenent de: el diagnòstic precoç i l'inici i adhesió adequada a la dieta terapèutica, el període i intensitat de debut de crisis encefalopàtiques agudes i el perfil excretor d'àcid glutàric (GA) en alguns casos.

Tot i la impredictibilitat del curs clínic dels pacients amb AG1, el període i intensitat del debut clínic de la malaltia són els factors que poden explicar millor l'evolució de les lesions estriatals, i en conseqüència, el desenvolupament de la simptomatologia.

Els pacients d'AG1 es poden classificar entre aquells amb un debut infantil (entre els 3 mesos i els 6 anys) i aquells amb un debut tardà (a partir dels 6 anys), sent aquesta la forma menys comuna.

El debut infantil agut el pateixen aproximadament un 90% dels pacients que no han rebut un diagnòstic i un tractament precoç. Els infants pateixen una CEA que condueix a una lesió estriatal bilateral aguda en aquest període de desenvolupament cerebral, el 95% d'ells es dona en els primers 24 mesos de vida. La lesió estriatal provoca trastorns de moviment complexos i distonia predominant, que pot donar a lloc a un estat distònic en el que contraccions musculars severes i generalitzades provoquen morbiditat i inclús mortalitat (Boy et al., 2023; Kölker et al., 2006). Altres manifestacions que s'han descrit en el debut infantil agut, són les hemorràgies subdursals, la macrocefàlia, episodis d'espasmes i convulsions (Larson & Goodman, 2019).

En paral·lel, també s'han observat pacients amb un debut infantil de lesió estriatal però sense una CEA inicial. A diferència dels trastorns de moviments d'inici agut, en aquest cas, la lesió estriatal d'inici insidiosa es manifesta més tard i menys severa, i la manifestació de distonia és menys greu. De fet, aquest fenotip de debut infantil insidiós s'ha relacionat amb una manca d'adherència a les mesures terapèutiques, i es dona en un 10-20% dels pacients simptomàtics (Boy et al. 2018; Kölker et al. 2006).

Pel que fa al debut tardà, es refereix a l'inici de manifestacions clíniques en qualsevol moment després dels 6 anys de vida. Els pacients descrits són en gran part alts excretors, i la simptomatologia pot abastar des d'individus asimptomàtics fins a afectacions neurològiques (Healy et al., 2022). La clínica comprèn des de mals de cap crònics, macrocefàlia, pèrdua de memòria, disàrtria, debilitat, epilèpsia i dificultat per a la coordinació (Larson & Goodman 2019).

En conjunt, l'esperança de vida en els pacients és molt variable degut a la variabilitat del espectre clínic així com al biaix en el diagnòstic i tractament de la malaltia. Aproximadament, la meitat dels pacients moren durant la primera dècada de la vida en el transcurs d'un episodi agut o bé en les conseqüències mèdiques que se'n deriven (Kyllerman et al. 2004).

1.3.3.1. Correlació genotip - fenotip

Al llarg dels últims anys, diferents autors han estudiat les possibles correlacions entre el genotip, l'activitat residual de l'enzim GCDH i l'excreció urinària de GA i 3-OH-GA. Els pacients d'AG1 es poden classificar bioquímicament en funció de la quantitat d'excreció de GA en orina. Se'n poden distingir dos grups, baixos excretors (GA < 100 mmol/mol de creatinina i lleus augments de 3-OHGA) i alts excretors GA > 100 mmol/mol de creatinina i alts augments de 3-OHGA) (Baric et al., 1999; Busquets et al., 2000).

Per una banda, s'ha demostrat l'existència d'una relació entre el genotip, l'activitat GCDH i el fenotip excretor. Les variants patogèniques associades amb una activitat residual substancial de GCDH (fins al 30%) estan associades amb un fenotip excretor baix de metabòlits dicarboxílics. Mentre que variants que donen lloc a una activitat nul·la o lleu de GCDH (0-3%), estan relacionades amb un perfil d'alts excretors. La variant c.1204C>T (p.Arg402Trp) que és la mutació més freqüent en població caucàsica, juntament amb la variant c.877G>A (p.Ala293Thr), estan associades al grup de "alts excretors" que presenta una alta excreció dels metabòlits mencionats que s'acumulen, representant ambdues el 56% dels al·lels. Pel que fa al grup de pacients "baixos excretors" amb una excreció menor de metabòlits, les mutacions més comunes són c.1198G>A (p.Val400Met) i c.680G>C (p.Arg227Pro), detectades en el 53% dels al·lels (Busquets et al. 2000).

Tot i que hi ha dos grups clarament diferenciats agrupant genètica i bioquímica, no s'ha pogut establir una correlació clara amb el fenotip clínic. Tan baixos com alts excretors tenen el mateix risc de presentar lesió estriatal i una clínica severa (Taula 1.1). Aquest fet, suggereix que la severitat de les manifestacions clíniques podria estar relacionada amb el desenvolupament de les CEA, i no pas amb el genotip o activitat enzimàtica residual tal i com s'hipotetitzava (Busquets et al., 2000; Christensen et al., 2004). En la mateixa línia, s'ha estudiat la possible correlació genotip-fenotip analitzant dades de més de 500 pacients. Concloent altra vegada que no hi ha una correlació òbvia entre el perfil excretor i el desenvolupament de símptomes clínics per a l'AG1. A més, s'especula sobre les possibles modificadors que poden influenciar en la severitat del fenotip clínic, així com factors ambientals,

variants genètiques en la mateixa via o l'entorn prenatal que pugui afectar a l'epigenoma entre d'altres (Schuurmans et al., 2023)

Taula 1.1. Correlació del perfil excretor amb la presentació clínica. Correlacions mutacions, activitat GCDH, perfil excretor i fenotip clínic en el cas de les quatre mutacions amb major prevalença en 35 famílies espanyoles. Taula adaptada de Busquets et al., 2000.

Genotip	Canvi proteic	Activitat GCDH	Perfil excretor	Fenotip clínic
c.1204C>T	p.Arg402Trp	Nul·la	Alt	Sever, mitjà i lleu
c.877G>A	p.Ala293Thr	Nul·la	Alt	Sever i mitjà
c.1198G>A	p.Val400Met	Residual	Baix	Sever i mitjà
c.680G>C	p.Arg227Pro	Residual	Baix	Sever i mitjà

Tanmateix, estudis recents basats en models *in vitro* de les variants patogèniques de fins a una cinquantena de pacients, han trobat una correlació inesperada entre la quantitat de proteïna de GCDH i l'aparició de CEA en pacients d'AG1. Concretament, genotips amb major abundància de GCDH s'han relacionat amb pacients amb CEA més agudes, sent aquestes crisis les principals manifestacions clíniques de l'AG1. En resum, aquest estudi obre la porta establir una correlació genotip – fenotip clínic, i en últim terme poder predir el risc d'individus amb AG1 aparentment asimptomàtics a patir CEA (Yuan et al. 2023).

1.3.4. Diagnòstic

El diagnòstic d'AG1 de pacients que presenten un debut clínic s'inicia amb l'estudi del nivells dels àcids GA i 3-OHGA en orina mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses o mitjançant espectrometria de masses en tàndem (MS/MS, per les seves sigles en anglès). També es valora la concentració de C5DC en orina i plasma o sang impregnada en paper mitjançant MS/MS. Un cop realitzat aquest estudi es confirma el diagnòstic amb l'estudi genètic del gen *GCDH*. Si no s'obté un diagnòstic genètic definitiu, es pot mesurar l'activitat enzimàtica de GCDH en fibroblasts o leucòcits (Boy et al., 2023). Si s'obté el genotip, es pot oferir un assessorament genètic a la família i es poden realitzar futurs diagnòstic prenatals mitjançant l'estudi de mutacions familiars en DNA extret de vellositats de còrion o amniòcits cultivats.

També les troballes en la ressonància magnètica com ara l'afectació dels ganglis de la base i les hemorràgies subduralson molt característics dels pacients amb AG1 (Mohammad et al., 2015; Vester et al., 2016). Pel que fa a les hemorràgies subduralson, aquestes s'han descrit en un 20-30% dels pacients després del debut clínic, concentrant-se principalment en pacients alt excretors (Boy et al. 2021b).

Tanmateix, l'AG1 es una de les malalties incloses en els Programes de Cribratge Neonatal (PCN) en un nombre creixent de països d'arreu del món. El metabòlit que es mesura per la seva detecció és la C5DC en sang impregnada en paper mitjançant MS/MS. La mostra s'obté del taló dels nounats entre les 24 i 72h després del naixement.

La sensibilitat estimada del PCN per al diagnòstic d'AG1 és d'un 95%. Un cop s'obté un cas positiu, es deriva el nadó a la unitat clínicade referència per confirmar el diagnòstic analitzant els nivells de GA i 3-OHGA en orina i de C5DC en orina i plasma o sang impregnada en paper, seguit dels estudis genètics, i enzimàtics si és necessari. Cal destacar però, que no tots els pacients poden ser diagnosticats a través dels PCN, ja que hi ha individus, normalment aquells amb perfil baix excretor, amb una concentració de C5DC normal o lleugerament augmentada en les mostres de sang impregnada en paper (Kölker et al., 2011). En aquests casos i en els casos que no es té disponibilitat del PCN, el diagnòstic es dona arrel del debut clínic i de troballes neuroradiològiques. De la mateixa manera, el diagnòstic es confirma mitjançant una anàlisi genètica o bioquímica mesurant el nivell d'àcids orgànics en orina (Larson & Goodman 2019).

En les dues estratègies de diagnòstic, una vegada detectat algun valor alterat indicatiu d'AG1, s'inicien les mesures terapèutiques.

1.3.5. Tractament

Actualment, el tractament per a l'AG1 consisteix en un tractament pal·liatiu nutricional, que té com a principal objectiu reduir el substrat de l'enzim GCDH. Les mesures terapèutiques es classifiquen en: la teràpia metabòlica regular i un tractament d'emergència que s'aplica únicament durant episodis aguts.

La teràpia metabòlica regular es basa per una banda, en la restricció dietètica de lisina i triptòfan, amb l'objectiu de reduir l'activitat catabòlica d'aquests aminoàcids per tal de reduir el substrat de la GCDH. Per altra, en la suplementació de carnitina per tal de contribuir a la desintoxicació fisiològica de l'augment de glutaril-CoA, ja que carnitina i glutaril-CoA es poden conjuguar formant C5DC, molècula amb capacitat de creuar la BHE i les membranes cel·lulars sense generar neurotoxicitat.

El tractament d'emergència es dona en condicions en que el pacient està en risc de descompensació durant un episodi febril, o en procés de cirurgia o vacunació. El principal objectiu és prevenir l'aparició de lesions estriatals. Els principis bàsics del tractament són: la prevenció o reversió de l'estat catabòlic mitjançant l'administració d'una alta ingesta d'hidrats de carboni, la reducció de metabòlits neurotòxics mitjançant l'omissió transitòria de proteïnes naturals durant 24-48h, l'augment de la formació de C5DC mitjançant suplementes de carnitina, i el manteniment d'hidratació, electròlits i estat del pH mitjançant líquids enterals o per via intravenosa (IV).

No obstant això, per tal d'evitar episodis aguts, s'aconsella als pacients evitar l'excés de proteïnes dietètiques o desnutrició proteica, el dejuni prolongat, les infeccions, la febre o la ingesta calòrica inadequada, ja que això induiria un estat catabòlic on es catabolitzaria la lisina provocant un augment dels metabòlits neurotòxics (Larson & Goodman 2019).

Cal destacar, que els protocols terapèutics estan adaptats a l'edat dels pacients. Mentre que durant els 6 primers anys de vida, les guies descriuen de forma exhaustiva la teràpia metabòlica a ingerir al dia; concretament, la quantitat de lisina (proteïna natural), la fórmula específica per a AG1, la suplementació de carnitina i l'aportació calòrica. A partir dels 6 anys, és a dir, després del període de major vulnerabilitat de lesió estriatal aguda, els requeriments dietètics són més laxos, focalitzant-se únicament en una ingesta controlada de proteïna i una suplementació lleu de carnitina (Figura 1.4) (Larson & Goodman 2019).

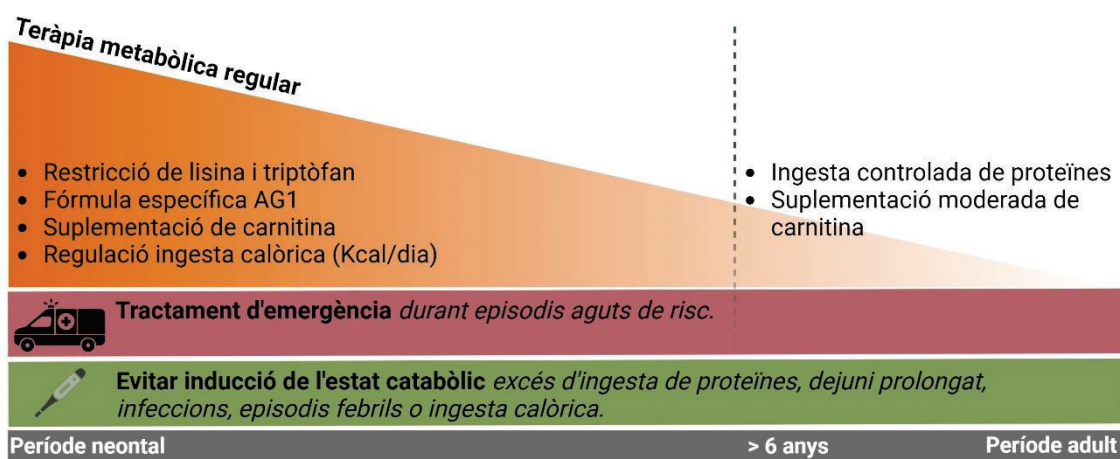


Figura 1.4. Progressió del protocol terapèutic actual per a l'AG1 en funció de l'edat de l'individu. Requeriments de la teràpia metabòlica regular, el tractament d'emergència i les premisses per tal d'evitar la inducció de l'estat metabòlic en funció de l'edat del pacient d'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1).

En conjunt, la implantació del tractament metabòlic i el seguiment regular per part de centres metabòlics especialitzats millora significativament l'evolució dels pacients diagnosticats mitjançant els PCN. A més, hi ha un gran consens en la importància de la implementació del tractament metabòlic per part d'un equip interdisciplinari que inclogui pediatres, dietistes i infermeres. Així com les famílies i els pacients compten amb formacions i protocols de tractaments per a un major coneixement (Boy et al. 2018, 2021a; Märtner et al. 2021).

El tractament dietètic i el tractament intensiu d'emergència han reduït la freqüència de les CEA i els trastorns del moviment fins a un 10%-20% d'afectes (Larson & Goodman, 2019). Malgrat això, el 25-33% dels pacients encara desenvolupen CEA i es mantenen amb dèficits motrius i de llenguatge a llarg termini, tot i un diagnòstic precoç i mantenir una bona adherència a la dieta (Boy et al., 2021a; Jafari et al., 2011). A més, hi ha efectes secundaris que es deriven del tractament dietètic com són la desnutrició, el creixement per sota de la corba òptima i els trastorns de comportament alimentari (Larson & Goodman 2019).

Finalment cal recalcar que, malgrat totes les directrius i recomanacions sobre les condicions dietètiques, encara hi ha inconsistències en la gestió de la nutrició. Les recomanacions de nutrició són divergents entre equips mèdics, i encara hi ha incertesa sobre com assessorar els pacients en l'optimització de la dieta i en quin període s'ha de produir la liberalització de la dieta (Bernstein et al. 2020).

Amb tot plegat s'evidencia la necessitat d'obtenir altres opcions terapèutiques més efectives per evitar seqüeles irreversibles i millorar el pronòstic dels pacients detectats.

1.3.6. Models experimentals

En el camp de la recerca biomèdica, l'ús de models cel·lulars i animals ha esdevingut una eina imprescindible per aprofundir en la comprensió dels mecanismes fisiopatològics de la malaltia i avaluar l'eficiència de potencials estratègies terapèutiques.

1.3.6.1. Models cel·lulars

Els estudis en cultius cel·lulars d'AG1 es poden classificar en tres tipologies en funció del seu origen: cultius cel·lulars partint de cèl·lules aïllades de pacient, cultius cel·lulars derivats de models animals i línies cel·lulars generades mitjançant enginyeria genètica.

Pel que fa als cultius cel·lulars derivats de pacients, des de fa tres dècades que es treballa amb cultius de fibroblasts primaris o limfòcits aïllats de pacients, per realitzar assajos d'activitat enzimàtica de la GCDH que han permès aprofundir en el diagnòstic i establir relacions genotípiques – fenotípiques (Christensen et al., 1993; van der Watt et al., 2010). Recentment, s'han generat línies de cèl·lules mare pluripotents induïdes (hiPSC) derivades de cultius de fibroblasts primaris de quatre pacients. Aquestes línies hiPSC poden contribuir significativament a entendre millor el mecanisme molecular subjacent a l'AG1 i proporcionar models d'estudi per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques (Schuurmans et al. 2024).

Els cultius cel·lulars de cèl·lules aïllades de models animals d'AG1 són els més utilitzats, ja que permeten treballar amb material biològic del nucli estriatal, la regió més afectada a l'AG1. A la següent taula es recullen els estudis que s'han descrit a la bibliografia; principalment amb neurones estriatals i astròcits derivats de rates i ratolins, i que han permès aprofundir en el coneixement de l'alteració del metabolisme energètic i la neurodegeneració estriatal (Taula 1.2).

Taula 1.2. Recull bibliogràfic dels estudis amb models cel·lulars d'AG1 de cèl·lules aïllades de models animals AG1. Síntesi del tipus cel·lular utilitzat, l'animal d'origen, aportacions científiques en el camp de l'AG1 i referència.

Tipus cel·lular	Animal d'origen	Principals conclusions	Referència
Neurones estriatals aïllades en edat neonatal + Exposició a GA.	Rata Sprague-Dawley (SD) WT.	El GA activa els receptors NMDA (augmenta l'excitotoxicitat) i provoca danys neuronals induint apoptosi.	(Tian et al., 2014)
Cultiu mixte de l'escorça cerebral aïllada en edat neonatal + Exposició a 3OHGA.	Rata Wistar WT.	El 3-OHGA no és excitotòxic, tot i la presència de receptors NMDA funcionals.	(Freudenberg et al., 2004)
Neurones + Exposició a 3OHGA.	Embrions de pollastre WT.	El 3-OHGA activa els receptors NMDA i alteració de l'homeòstasi del Ca ² contribueixen al dany cel·lular.	(Kölker et al., 2002)
Neurones estriatals aïllades en edat neonatal + Transfecció amb shRNA contra GCDH.	Rata Sprague-Dawley (SD) WT.	La suplementació amb arginina i homoarginina redueix l'apoptosi i millora el metabolisme energètic.	(Fu et al., 2014)
Astròcits aïllats a P24-30 + Exposició a GA.	Rata Sprague-Dawley (SD) WT.	Alteració de la comunicació durant la neurotransmissió glutamatèrgica entre neurones i astròcits, conduint a la mort dels astròcits.	(Komatsuzaki et al., 2018)
Astròcits primaris de l'escorça cerebral aïllades en període neonatal.	Ratolí 129SvEv <i>Gcdh</i> ^{-/-} .	Alta susceptibilitat d'astròcits a l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial, conduint a la mort cel·lular.	(Rodrigues et al., 2017)
Co-cultius: Neurones estriatals i astròcits aïllats en edat neonatal.	Ratolí 129SvEv <i>Gcdh</i> ^{-/-} .	Els astròcits contribueixen en produir GA i 3OHGA en condicions d'estrès metabòlic, l'acumulació de GA indueix a un fenotip neurotòxic que mata les neurones estriatals i corticals per un mecanisme estrès oxidatiu dependent.	(Olivera-Bravo et al., 2015)
Co-cultius: Neurones de l'escorça cerebral aïllades en	Ratolí C57BL6/SJ129 <i>Gcdh</i> ^{-/-} .	El GA i 3OHGA interfereixen el transport entre astròcits i neurones dels intermediaris del cicle de l'àcid	(Lamp et al., 2011)

edat neonatal + Línia	tricarboxílic (TCA), conduint a lesions
d'astròcits murina	neuronal lesions i mort cel·lular.
11 ^{+/+}	

GA, àcid glutàric; 3-OHGA, àcid 3-hidroxiglutàric; SD, Sprague-Dawley; WT, *wild-type*; NMDA, àcid N-metil-D-aspartic; shRNA, seqüències de forqueta curta de RNA.

A més, amb l'objectiu de disposar de models *ex vivo*, els quals permeten una millor recapitulació dels processos *in vivo*, s'han generat models cel·lulars 3D basats en l'establiment de cultius organotípics a partir de models de rata i ratolí d'AG1. Seguint la línia de les troballes en co-cultius, els resultats han demostrat que l'acumulació de 3-OHGA és la responsable de provocar la mort d'astròcits i que l'acumulació intracerebral d'amoni desencadena la mort secundària d'altres tipus cel·lulars cerebrals (Cudré-Cung et al. 2019; Jafari et al. 2013).

Les línies cel·lulars generades mitjançant enginyeria genètica, s'agrupen en aquelles en que s'ha suprimit per complet l'expressió de GCDH mitjançant la generació d'un *knock out* (KO), o aquelles que s'ha introduït una mutació patogènica coneguda mitjançant la generació d'un *knock in* (KI). En la literatura s'ha reportat la generació de dues línies *Gcdh* KO, en un model cel·lular neuronal humà (SH-SY5Y; (Mateu-Bosch et al. 2024a)) i a partir de línies de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC; (Schoormans et al. 2023)). Ambdues línies es postulen com a models per aprofundir en el coneixement de la susceptibilitat a la neurotoxicitat i utilitzar-se com a plataformes d'estudi de futures propostes terapèutiques. Per altra banda, Keyser i col·laboradors han generat quatre línies KI en cèl·lules de ronyó de nadó de hamster (BHK). L'estudi de quatre mutacions patogèniques *missense* que afecten el centre catalític de l'enzim, han permès demostrar la influència que té la formació defectuosa de complexos de GCDH (homo i heteromèrics) en la reducció de l'estabilitat intramitocondrial i conseqüentment en ser la base fisiopatològica de l'AG1 (Keyser et al. 2008).

1.3.6.2. Models animals

Els estudis en models animals d'AG1 s'han realitzat principalment en rata i ratolí, s'han generat models KO de *Gcdh* o KI mitjançant enginyeria genètica.

En el cas dels ratolins, s'han generat únicament models KO en diferents soques amb contextos genòmics diferents. El model més utilitzat és el *Gcdh*^{tm1Dmk} (-/-) generat en ratolins C57Bl/6J per Koeller i col·laboradors l'any 2002 (Koeller et al., 2002). Aquest és el model utilitzat en aquesta tesi doctoral, i també l'han utilitzat en altres estudis (Amaral et al., 2012; Barzi et al., 2023; Bjugstad et al., 2006; Busanello et al., 2013; Keyser et al., 2008; Leandro et al., 2020; Mateu-Bosch et al., 2024b; Posset et al., 2015; Sauer et al., 2006, 2011; Thies et al., 2013; Zinnanti & Lazovic, 2010; Zinnanti et al., 2007, 2006). Altres línies murines en les quals s'han generat models KO pel gen *Gcdh* son: C57BL/6J/TIRF (Naylor et al., 2007), C129SvEv (Amaral et al., 2019; Guerreiro et al., 2019; Rodrigues et al., 2015; Seminotti et al., 2012, 2013, 2016, 2020, 2022), 1295vEv (Sauer et al., 2015), C6CBA (Pasquetti et al., 2017) i C57BL/6Crl × 129/SvCrl (Olivera-Bravo et al. 2019).

El model KO de Koeller es tracta d'un model que a nivell bioquímic mostra valors elevats de GA, 3-OHGA i C5DC en teixits perifèrics i cervell, sent molt similar als pacients humans d'AG1. No obstant això, aquest model no recapitula el fenotip neuropatològic del pacients amb AG1 (Koeller et al., 2002). Estudis posteriors han revelat la necessitat d'exposar els animals a dieta alta en proteïna o lisina (4,7% lisina), per tal de forçar la via del catabolisme de la lisina, i induir un fenotip clínic similar al dels pacients. La sobrecàrrega de lisina provoca CEA que cursen amb un augment significatiu dels paràmetres bioquímics i es desenvolupen símptomes de neurodegeneració estriatal (Zinnanti et al., 2006). Cal destacar que l'edat en la que es realitza l'exposició a dieta alta en lisina (HLD) és crítica, ja que la severitat de les lesions és edat-dependent. En ratolins d'edats primerenques amb cervells encara immadurs, necessiten més aportació energètica que un cervell madur, així doncs l'exposició a HLD en aquesta edat provoca una major producció i acumulació de metabòlits dicarboxílics, i conseqüentment la lesió estriatal generada és més severa. A més, la supervivència d'aquest model animal en exposar-se a HLD també s'ha vist

compromesa, fins a presentar una mortalitat d'un 60% als 4 dies post-HLD (Figura 1.5) (Zinnanti et al., 2007).

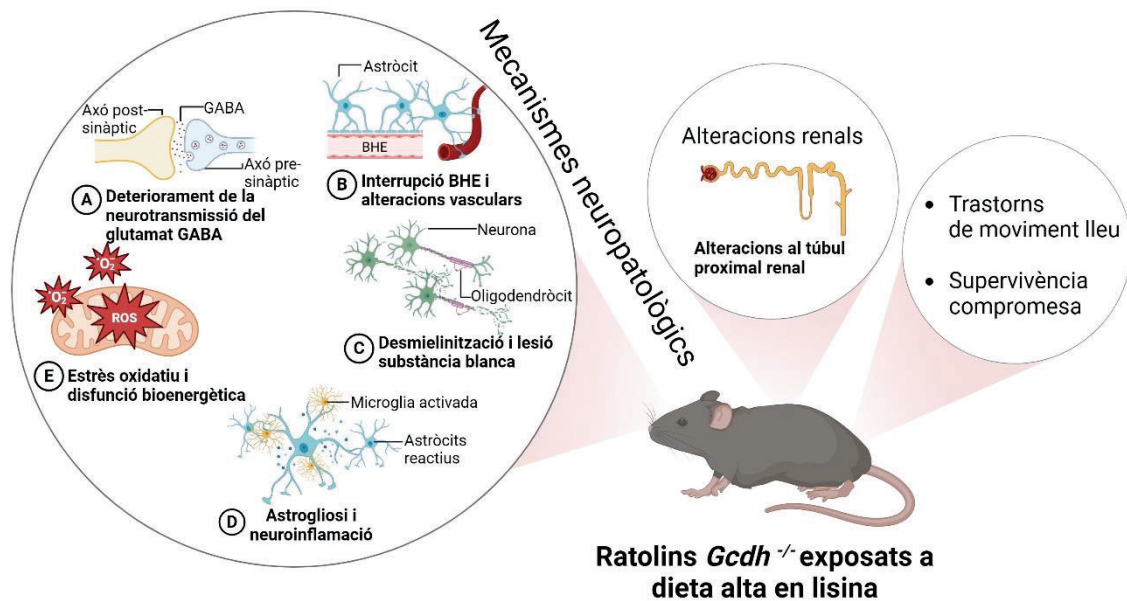


Figura 1.5. Representació esquemàtica dels mecanismes fisiopatològics i fenotípics dels ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a dieta alta en lisina. Principals alteracions neuropatològiques descrites a la bibliografia A: deteriorament de la neurotransmissió del glutamat/GABA, B: interrupció de la barrera hematoencefàlica (BHE) i alteracions vasculars, C: desmielinització i lesió de la substància blanca, D: astrogliosi i neuroinflamació, E: estrès oxidatiu i disfunció bioenergètica. Presència d'alteracions renals en el tubul proximal renal, trastorns de moviment lleu i supervivència compromesa. Figura adaptada de Wajner et al., 2019.

Pel que fa als models de la malaltia en rata, més enllà de la generació mitjançant enginyeria genètica, també s'han realitzat estudis en línies WT de l'efecte neuropatològic que provoca l'exposició als metabòlits dicarboxílics. Latini i col·laboradors han treballat amb rates Wistar WT, en els seus estudis demostren com l'exposició a GA i 3-OHGA indueix l'estrès oxidatiu en regions estriatals (Latini et al., 2005, 2007).

Respecte al model de rata generat mitjançant enginyeria genètica, Melo i col·laboradors han generat el primer model en rata d'AG1. Es tracta d'un model KI de la mutació p.Arg411Trp, l'homòleg de la seqüència de la mutació en el gen humà c.1204C>T (p.Arg402Trp), mutació més prevalent en caucàsics. De la mateixa manera que en els models d'AG1 de ratolí, el model en rata mostra un fenotip bioquímic d'alt excretor, que necessita d'una exposició a HLD per desenvolupar alteracions neuropatològiques (Gonzalez Melo et al., 2021b). A més, en aquest cas

també es va determinar una alteració sobre la funció renal, deguda a l'efecte crònic de la deficiència de GCDH (Gonzalez Melo et al. 2021a).

1.3.7. Perspectives terapèutiques

En els últims anys, la inclusió de l'AG1 en els PCN així com l'ampliació en el coneixement de les bases fisiopatològiques i de la disponibilitat de models experimentals de la malaltia, han fet que hi hagi un auge en l'estudi de noves aproximacions terapèutiques. No obstant això, fins la data no hi ha cap teràpia aprovada en les agències reguladores d'Europa, Estats Units o Xina (EMA, FDA o SFDA).

De manera genèrica les aproximacions terapèutiques per a MMH es basen en revertir les alteracions bioquímiques tòxiques provocades pel defecte metabòlic primari i pal·liar els efectes que provoquen principalment al SNC. Les estratègies terapèutiques es poden classificar en funció del punt del mecanisme en el intervenen, distingint-se'n teràpies de reducció de substrat, de reemplaçament o modulació a nivell genètic, post-transcripcional o enzimàtic entre d'altres (Figura 1.6) (Ginocchio & Brunetti-Pierri 2016).

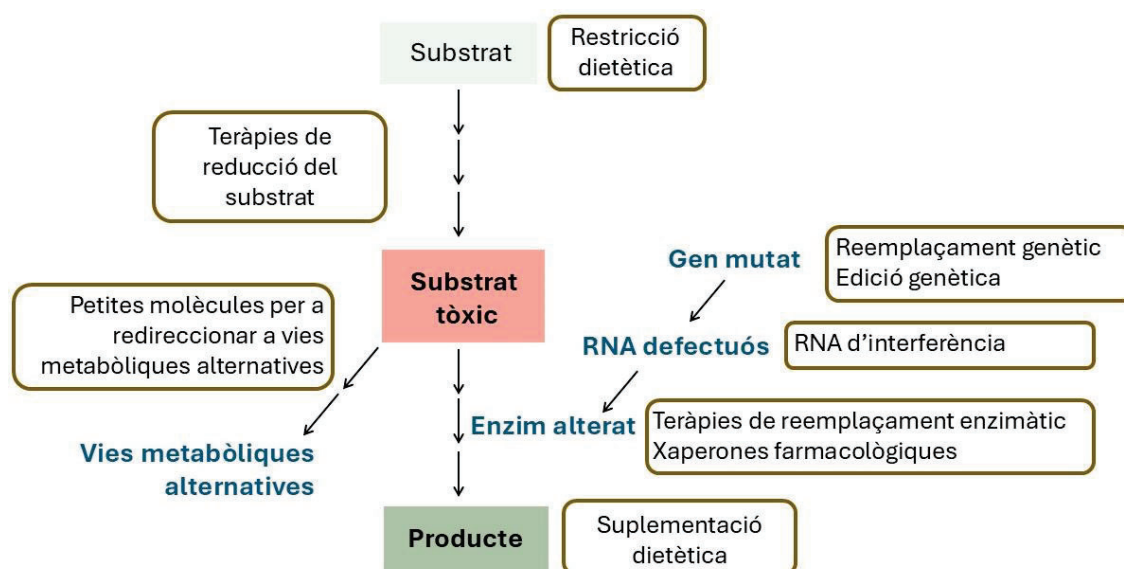


Figura 1.6. Estratègies de teràpies per a errors innats del metabolisme. Figura adaptada de (Ginocchio & Brunetti-Pierri, 2016).

Pel que fa a la teràpia de reemplaçament genètic, aquesta es basa en la introducció de la còpia funcional del cDNA de *GCDH*. A la literatura s'han descrit tres estratègies terapèutiques de reemplaçament genètic en models cel·lulars i ratolí *Gcdh*^{-/-}, totes

elles basades en la introducció exògena mitjançant un virus adenoassociat (AAV) per via sistèmica o intracerebroventricular (Barzi et al. 2023; Guo et al. 2022b; Mateu-Bosch et al. 2024a; b). Mentre els treballs de Guo i Mateu-Bosch proposen una teràpia gènica dirigida al SNC, Barzi exposa una teràpia gènica dirigida al fetge que permet rescatar el fenotip sever d'AG1. Donant lloc a qüestionar la manera en la que s'ha entès fins ara la fisiopatologia de l'AG1, i obrint portes a redirigir les línies de recerca de les possibles propostes terapèutiques (Houten & Coughlin 2023).

L'ús de xaperones farmacològiques és una opció terapèutica que ha sorgit degut a que la majoria de variants patogèniques *missense* en AG1 són mutacions conformacionals, i aquestes afecten al plegament de la proteïna i en comprometen la seva estabilitat (Barroso et al. 2023). Així doncs, l'administració de molècules amb activitat xaperona podria augmentar l'estabilitat del complex homo-i heteromèric, i per tant la funcionalitat de GCDH, essent una bona estratègia per al tractament de l'AG1. Lucas i col·laboradors han investigat l'efecte *in vitro* de cofactors i metabòlits mitocondrials com a potencial estabilitzadors en dues acil-CoA deshidrogenases de β -oxidació (Lucas et al. 2011). A més, estudis *in silico* amb la proteïna recombinant GCDH-p.Val400Met han demostrat un efecte de xaperona farmacològica per part de la riboflavina. Els resultats de la suplementació amb riboflavina, la qual precursora de FAD, indiquen que una major disponibilitat de flavina rescata la funcionalitat de la GCDH (Ribeiro et al. 2020).

Finalment, el fet que el defecte enzimàtic de l'AG1 comparteixi via de degradació amb trastorns causats per defectes enzimàtics sense conseqüències clíniques aparents, ha fet que s'hagi posat en el punt de mira la opció d'inhibir farmacològicament aquests enzims, com a possible diana d'una estratègia terapèutica de reducció de substrat (Leandro & Houten 2020). Tres línies de recerca han estudiat en models de ratolí d'AG1 l'efecte de la inhibició de AASS i DHTKD1, enzims que estan en el primer i cinquè pas de la degradació de la lisina respectivament (Figura 1.1). Cal destacar, que la inhibició farmacològica de l'AASS podria prevenir les conseqüències metabòliques en les dues MMH que tenen lloc a la via de degradació de la lisina, l'EDP i l'AG1 (Barzi et al. 2023; Biagosch et al. 2017; Leandro et al. 2020).

1.4. Teràpia gènica

La teràpia gènica és una aproximació terapèutica que es basa en la modificació del material genètic de les cèl·lules diana, mitjançant la introducció de seqüències d'àcid nucleic (DNA o RNA) exogen, amb la finalitat de prevenir o corregir una malaltia (Mulligan, 1993). Les estratègies de teràpia gènica es poden classificar en funció de diferents factors; del tipus de malaltia (malaltia de causa genètica o trastorn complex adquirit), del tipus de vector (viral o no viral, i integratiu o no integratiu), i de l'estratègia de transferència gènica utilitzada, en funció de si s'aplica *in vivo* (directament al pacient) o bé *ex vivo* (per modificació autòloga o transplant de cèl·lules al·logèniques). Depenent de quines siguin les necessitats terapèutiques s'escull una estratègia o una altra (Kumar et al., 2016).

Inicialment, el concepte bàsic en el que s'ha fonamentat la teràpia gènica ha estat en identificar un gen defectuós en una malaltia de causa genètica, integrar una còpia funcional del gen en un vector, i transferir-lo als pacients afectes. Conseqüentment, les cèl·lules transfectades integrarien la còpia funcional del gen absent o defectuós, conduint a la recuperació del defecte primari de la malaltia genètica. Actualment, més enllà de l'estratègia d'introducció d'una còpia funcional del gen per tal de recuperar-ne l'expressió, s'han explorat estratègies de modulació de l'expressió de gens existents (incrementar, silenciar o disminuir) o fins i tot de corregir la seqüència nucleotídica dels gens mutats mitjançant edició gènica (Figura 1.7) (Anguela & High 2019).

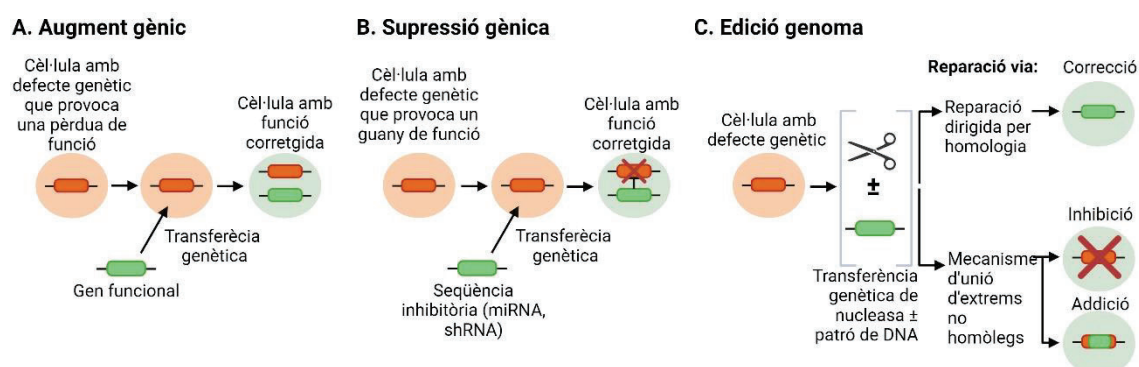


Figura 1.7. Fonament de teràpia gènica. La teràpia gènica inclou estratègies de A: augment gènic, B: supressió gènica i C: correcció mitjançant edició del genoma. Figura adaptada de Anguela & High, 2019.

Amb l'objectiu de transferir el material genètic terapèutic a les cèl·lules diana, s'han desenvolupat diferents tipologies de vectors que es poden classificar en virals o no virals en funció de la seva naturalesa. La majoria d'estratègies de teràpia gènica utilitzen vectors virals, concretament vectors lentivirals per a la transferència genètica *ex vivo* a cèl·lules mare o hematopoiètiques, i vectors virals adenoassociats (AAV) per a la transferència genètica *in vivo* a tipus cel·lulars post-mitòtics. Pel que fa a la integració del material genètic exogen al genoma cel·lular, en cèl·lules mare o en divisió és important utilitzar vectors integratius per tal d'assegurar que el DNA exogen es transmet a la descendència cel·lular. Per contra, en el context de la transferència *in vivo*, les cèl·lules diana són cèl·lules post-mitòtiques que no es divideixen. Així doncs, per tal d'obtenir una expressió sostinguda del material genètic introduït a llarg termini, l'expressió episomal del DNA exogen estable és suficient per a aquesta aproximació (Anguela & High 2019; Naldini 2015).

L'interès creixent en la teràpia gènica s'ha inspirat en el reconeixement que, almenys en principi, un tractament amb una sola dosi permet aconseguir un benefici clínic durador i potencialment curatiu (Dunbar et al. 2018). Des del primer assaig clínic de transferència gènica en humans l'any 1989 (Rosenberg et al., 1990), fins a la data s'han autoritzat més de 2.500 assajos clínics en teràpia gènica per a nombroses malalties d'origen genètic (ClinicalTrials.org). No obstant això, únicament 21 productes basats en teràpia gènica, majoritàriament per a malalties minoritàries, s'han aprovat per part de les agències reguladores (EMA, FDA i SFDA). Suggestint que la teràpia gènica com a aproximació terapèutica per a malalties minoritàries, representa un camp relativament prometedori i d'interès per a la translació clínica, i demostra la viabilitat i seguretat d'aquesta (Arabi et al. 2022; Gicquel et al. 2023).

1.4.1. Estratègies de silenciament genètic

La supressió de l'expressió gènica es pot induir mitjançant teràpia gènica utilitzant la tecnologia antisentit basada en la degradació del RNA missatger (mRNA, per les seves sigles en anglès). Concretament, el silenciament gènic es dona a nivell post-transcripcional mitjançant la complementarietat d'una seqüència curta de DNA o RNA, que tan pot ser endògena com exògena, i la seqüència diana d'un mRNA diana a degradar. La degradació específica del mRNA dona lloc a la reducció de l'expressió

de proteïnes implicades o responsables dels processos de la malaltia, i així es reverteix el fenotip de la malaltia (Crooke et al. 2021; Sayed et al. 2022).

El potencial dels nucleòtids per actuar com a agents antisentit, inhibint la replicació viral en un cultiu cel·lular, va ser descobert per Zamecnik i col·laboradors l'any 1987. L'estudi va ser pioner en utilitzar un oligonucleòtid antisentit de seqüència complementària a una seqüència de mRNA diana, per induir la degradació del mRNA diana i silenciar-ne l'expressió (Zamecnik & Stephenson 1978).

La teràpia gènica basada en tecnologia antisentit es pot classificar en quatre molècules terapèutiques: els oligonucleòtids antisentit (ASO), les seqüències petites d'interferència de RNA (siRNA, per les seves sigles en anglès), les seqüències de forqueta curta de RNA (shRNA, per les seves sigles en anglès) i els microRNA artificials (miRNA, per les seves sigles en anglès). Les tecnologies difereixen entre si en funció de la naturalesa de l'estructura (monocatenària o bicatenària), i de la necessitat o no del processament per via del mecanisme de RNA d'interferència (iRNA, per les seves sigles en anglès), veure *Taula 1.3* (Guo et al. 2024; Kotowska-Zimmer et al. 2021).

Taula 1.3. Comparativa entre les diferents estratègies de tecnologia antisentit. Taula adaptada de Kotowska-Zimmer et al., 2021.

	ASO	siRNA	shRNA	miRNA
Dibuix				
Estructura	Monocatenària	Bicatenària	Bicatenària	Bicatenària
Longitud (nucleòtids)	8-50nt	21nt	60nt	60nt ± 80-250 nt seqüències flanquejant
Complementarietat cadenes	-	100%	100%	< 100%, nucleòtids no complementaris
Equivalent endogen	DNA	siRNA	pre-miRNA	pri-miRNA
Degradació de mRNA via	RNasa H1	Mecanisme de RNA d'interferència		
Processament cel·lular iRNA	-	Sí, Dicer	Sí, Dicer	Sí, Drosha i Dicer
Origen	Sintètic	Sintètic	Vector d'expressió, sota promotors PolIII	Vector d'expressió, sota promotors PolIII
Expressió	Transitòria	Transitòria	Transitòria/ Estable	Transitòria/ Estable
Dosi	Múltiple	Múltiple	Única	Única

ASO, oligonucleòtids antisentit; siRNA, seqüències petites d'interferència de RNA; shRNA, seqüències de forqueta curta de RNA; miRNA, microRNA artificials; nt, nucleòtids.

Mentre que en ASO la degradació del mRNA es realitza via RNasa H1, les altres molècules ho fan via el mecanisme del iRNA (Figura 1.8).

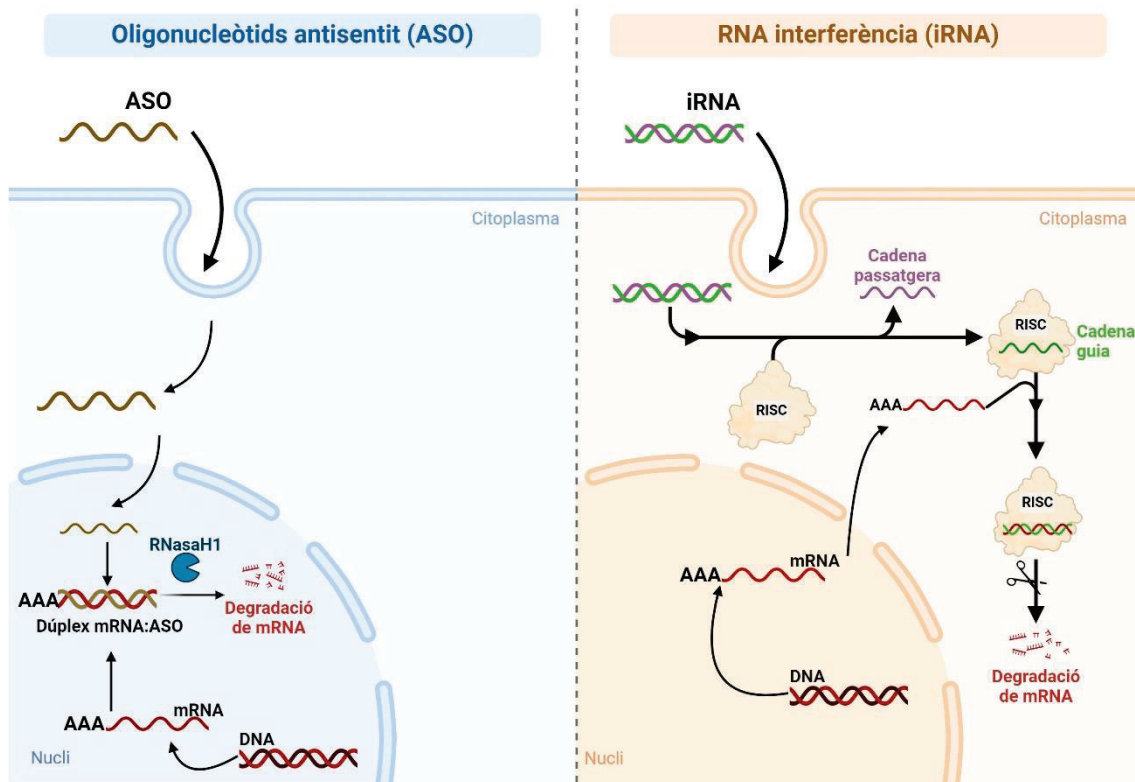


Figura 1.8. Mecanismes de degradació del mRNA mitjançant ASO i el mecanisme d'iRNA. El mecanisme d'acció dels oligonucleòtids antisentit (ASO) es basa en l'ASO monocatenari que entra a la cèl·lula i al nucli; un cop s'uneix al mRNA diana, el dúplex mRNA:ASO de doble cadena és reconegut per la RNasaH1 i degradat. El mecanisme de RNA d'interferència (iRNA) es basa en un RNA de doble cadena que entra a la cèl·lula, i roman al citoplasma. S'escindeix la cadena passatgera, i es forma el complex d'inducció al silenciament del RNA (RISC) conjuntament amb la cadena guia. El mRNA diana és reconegut per la cadena guia del complex RISC, i es degrada. Figura adaptada de Gareri et al., 2022.

1.4.1.1. Oligonucleòtids antisentit

Els ASO són uns oligonucleòtids terapèutics d'una sola cadena que s'assimilen al DNA monocatenari. La cadena de DNA forma un heterodúplex DNA:RNA amb la seqüència mRNA diana, mitjançant l'aparellament de bases complementàries tipus *Watson-Crick*, la endonucleasa RNasa H1 s'uneix al dúplex i efectua la degradació de manera específica. Així doncs, l'ús dels ASO que estan dissenyats per actuar específicament sobre una seqüència diana de mRNA, permeten la interferència del mecanisme de *splicing*, la regulació post-transcripcional o a la unió RNA:proteïna (Fusco et al. 2019; Sardone et al. 2017).

Un dels majors inconvenients dels ASO és la inestabilitat dels oligonucleòtids, ja que poden ser fàcilment degradats per les nucleases dels fluids biològics. En la última dècada, s'ha estat explorant l'ús de nucleòtids amb modificacions químiques que fa que els oligonucleòtids també siguin més potents i menys tòxics (Crooke et al. 2021; Sharma & Watts 2015).

Com a alternativa als ASO en el silenciament post-transcripcional del mRNA, sorgeixen les estratègies basades en iRNA, les quals tenen més potència i ofereixen més versatilitat (Robinson 2004).

1.4.1.2. Molècules basades en RNA d'interferència

La tecnologia de iRNA és un mecanisme endogen evolutivament conservat, que permet suprimir l'expressió gènica a nivell de mRNA (Setten et al., 2019). Des de la primera descripció del mecanisme l'any 1998, en la que es va identificar el RNA de doble cadena com a factor desencadenant de la interferència del RNA (Fire et al., 1998), s'ha estudiat aquest fenomen natural com a tecnologia que permet el silenciament de l'expressió de qualsevol gen d'interès mitjançant seqüències de RNA específicament dissenyades (Kotowska-Zimmer et al. 2021).

A nivell de teràpia gènica antisentit, hi ha tres estratègies que treballen amb la via de iRNA: les seqüències petites d'interferència de RNA (siRNA), les seqüències de forqueta curta de RNA (shRNA) i els microRNA artificials (miRNA). Cada una s'incorpora al mecanisme endogen de iRNA en un punt diferent de la via per ser processades i acabar formant molècules de RNA interferents (siRNA o miRNA), que són capaces d'induir la degradació post-translacional, i finalment el silenciament genètic (Setten et al. 2019).

Prèviament a l'entrada al mecanisme d'iRNA, les estratègies divergeixen de les següents maneres (Kotowska-Zimmer et al., 2021; Lam et al., 2015):

- siRNA sintètics: s'introdueixen de forma exògena, arriben al citoplasma i s'incorporen al mecanisme d'iRNA formant siRNA madurs.
- shRNA: s'introdueixen normalment a través de vectors virals, es transcriuen al nucli cel·lular mitjançant la RNA polimerasa III donant a lloc a molècules

pre-miRNA. Es transporten al citoplasma per tal d'entrar al mecanisme d'iRNA mitjançant el complex format per Exportina 5 (Exp5), on s'hi incorporen formant miRNA madurs.

- miRNA: s'introdueixen normalment a través de vectors virals, es transcriuen al nucli cel·lular mitjançant la RNA polimerasa II donant a lloc a molècules pri-miRNA. El complex format per la RNasa III nuclear *Drosha* processa aquests pri-miRNA per generar molècules pre-miRNA. Es transporten al citoplasma per tal d'entrar al mecanisme d'iRNA mitjançant el complex format per Exp5, on s'hi incorporen formant miRNA madurs.

El mecanisme d'iRNA endogen s'inicia amb els RNA de doble cadena (dsRNA, per les seves sigles en anglès), subministrats de manera exògena (siRNA) o expressats dins de les cèl·lules com els pri-miRNA o pre-miRNA. Es divideix en dues fases consecutives entre elles: la fase iniciadora i l'efectora (Sparmann & Vogel, 2023; Xu et al., 2019).

- Fase iniciadora: el dsRNA és processat al citoplasma pel complex enzimàtic DICER (amb dominis d'unió a RNA, helicassa i RNasa III). Es generen petites molècules de 21-23 nucleòtids amb estructura bicatenària, amb extrems protuberants que són les molècules RNA interferents (siRNA o miRNA) mediadores del procés de silenciament.
- Fase efectora: L'activitat helicassa de DICER separa les dues cadenes de iRNA i només una de les dues cadenes serà incorporada al complex RISC (complex d'inducció al silenciament del RNA) associat a Argonaute 2 (Ago2), mentre que l'altra serà degradada. La cadena incorporada s'anomena cadena guia, i és la que determina el reconeixement de la seqüència de mRNA diana per complementarietat de bases. Els siRNA madurs interaccionen amb la seqüència mRNA diana amb una complementarietat perfecta o gairebé perfecta, i indueixen la degradació específica de la seqüència de mRNA mitjançant l'activitat de tall d'Ago2. En canvi, els miRNA madurs tendeixen a interaccionar amb seqüències de mRNA diana que no són 100% complementàries, i provoquen repressió de la traducció a proteïna i degradació de la transcripció del mRNA (Figura 1.9).

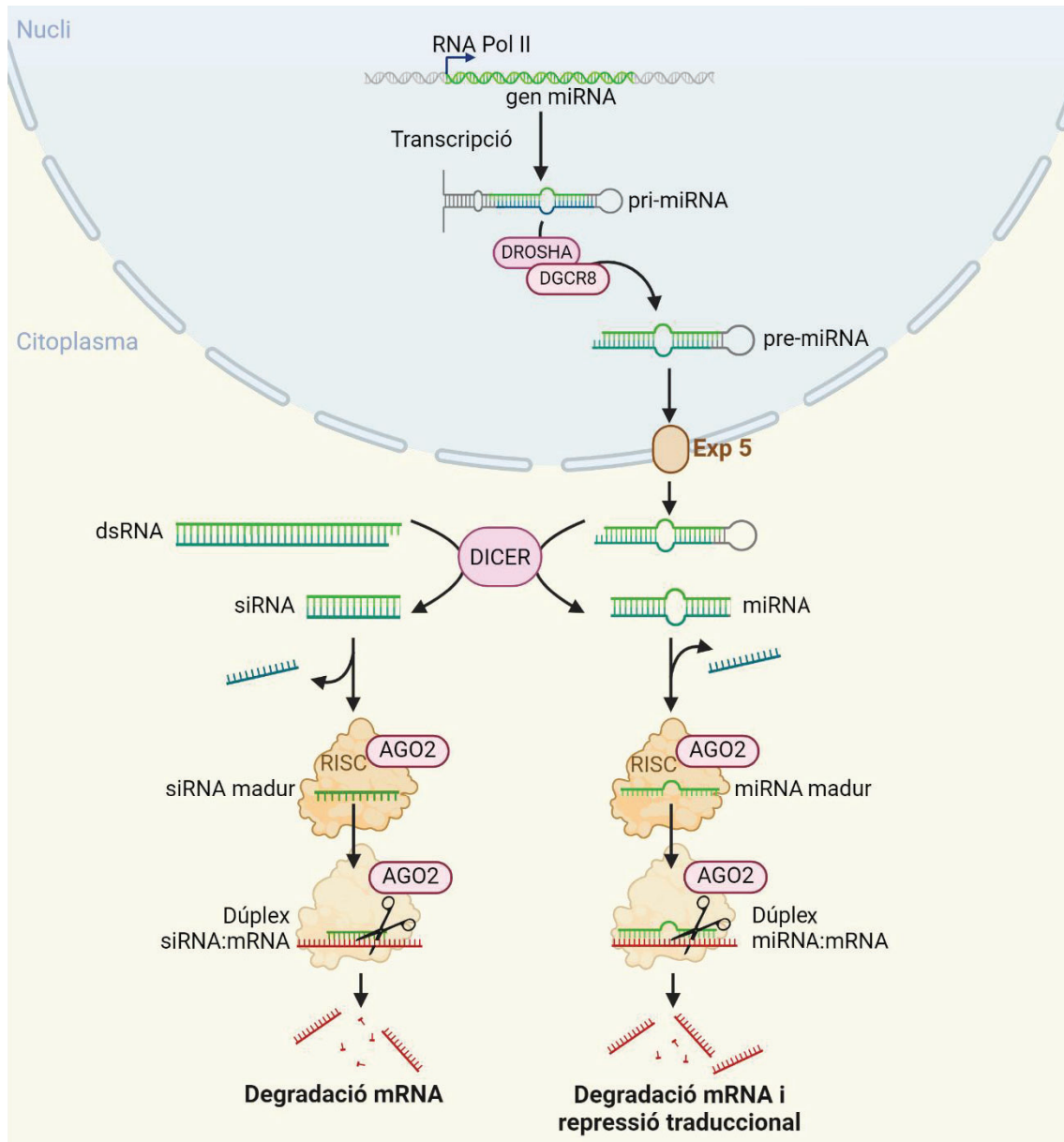


Figura 1.9. Mecanismes de silenciament gènic de siRNA i miRNA. siRNA: la doble cadena de RNA (dsRNA) és processat per Dicer, i posteriorment s'escindeix la cadena sentit o passatgera. La cadena guia del siRNA s'introdueix al complex d'inducció al silenciament del RNA (RISC) conjuntament amb la proteïna Arognaute 2 (Ago2). Aleshores, la cadena guia orienta el RISC actiu cap al mRNA diana. La unió completa complementària entre la cadena guia del siRNA i el mRNA diana genera la degradació del mRNA. miRNA: la transcripció del gen miRNA es realitza per la RNA polimerasa II al nucli per donar pri-miRNA, que és processat per Drosha per formar el pre-miRNA. El pre-miRNA és transportat per Exportina 5 (Exp 5) al citoplasma on és processat per Dicer en miRNA. Es descarta la cadena passatgera i la cadena guia de miRNA s'introdueix al RISC, i és guiat per la cadena guia cap al mRNA diana mitjançant una unió parcialment complementària. El mRNA s'inhibeix mitjançant la repressió de la traducció, la degradació o l'escissió. Figura adaptada de Lam et al., 2015.

L'eficiència i potencial del silenciament genètic ve donada pel disseny de la cadena guia i la seva complementarietat a la seqüència mRNA diana, i pel nombre de molècules efectores i la temporalitat de la seva expressió a les cèl·lules diana. Pel que fa al dissenys, hi ha múltiples premisses i guies que assessoren en dissenys amb l'objectiu de maximitzar l'eficiència de silenciament i reduir-ne els possibles efectes no desitjats o *off-target* (Bofill-De Ros & Gu, 2016; Watanabe et al., 2016). Respecte a la generació de molècules efectores, les estratègies de shRNA i miRNA aporten un efecte més perllongat i potent que els siRNA sintètics, ja que s'introdueixen mitjançant vectors d'expressió sota una seqüència promotora que permet la generació de múltiples molècules efectores (Lam et al., 2015). Cal destacar, que els miRNA s'expressen sota promotors pol II, fet que permet modular-ne l'expressió i dirigir-la cap als teixits diana, per contra els shRNA ho fan sota promotors pol III (Maczuga et al., 2012; Pfister et al., 2017). Altres factors a tenir en compte són els possibles efectes secundaris derivats d'efectes *off-target*, l'activació de la resposta immune innata i la possible saturació de la maquinària endògena del processament del miRNA (Kotowska-Zimmer et al. 2021).

En aquesta tesi doctoral s'ha explorat l'ús de miRNA com a estratègia inductora del silenciament genètic del AASS. De cara a la translació clínica, la gran majoria dels enfocaments basats en iRNA han utilitzat virus AAV com a eines de lliurament del material genètic (Valdmanis & Kay, 2017). Tot i els avenços en la investigació, el camp de la terapèutica basada en miRNA es troba en etapes primerenques, i només uns pocs productes han arribat al desenvolupament clínic. Fins a la data, hi ha quatre medicaments basats en siRNA aprovats per la FDA: *Patisiran* per a l'amiloidosis hereditària per transtiretina, *Givosiran* per a la porfíria hepàtica aguda, *Lumasiran* per a l'hiperoxalúria primària tipus 1, i l'*Inclisiran* per a l'hipercolesterolemia primària o la dislipidèmia mixta. Així com cinc siRNA i diverses teràpies basades en miRNA en assajos clínics (Traber & Yu, 2023). Els reptes clau inclouen establir la sensibilitat, l'especificitat i la selectivitat dels miRNA, mitigar les reaccions immunogèniques i els efectes *off-target*, així com desenvolupar mètodes millorats per al lliurament dirigit i determinar la dosi òptima per a l'eficàcia terapèutica alhora que es minimitzen els efectes secundaris (Seyhan 2024).

1.4.2. Vectors virals adenoassociats

Un factor clau en la teràpia gènica és el transport eficient dels gens al teixit o cèl·lules diana. La selecció d'un vector concret estarà influenciada per la naturalesa de la malaltia i la necessitat d'una expressió a curt o llarg termini (Bulcha et al. 2021).

En aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat els virus adenoassociats (AAV) com a vectors de transferència de la teràpia gènica. Actualment, són els vectors virals més utilitzats degut al excel·lent perfil de seguretat, la no patogenicitat i l'habilitat per induir una expressió del transgèn d'interès a llarg termini en una àmplia varietat de teixits. A més, els vectors derivats dels AAV estan molt ben caracteritzats, ja que estan sent utilitzats àmpliament en diversos protocols de teràpia gènica *in vivo* per a diferents malalties en clínica humana (Mingozzi & High 2011; Wang et al. 2019).

1.4.2.1. Biologia dels virus adenoassociats

Els virus AAV salvatges, dels quals en deriven els vectors AAV, pertanyen a la família *Parvoviridae* que forma part del gènere *Dependoviridae*. Es van descriure per primera vegada l'any 1965, com a partícules petites que contenen DNA en preparacions d'adenovirus (Ad) de simi. A l'inici, es van considerar virus defectuosos, ja que necessitaven d'una inoculació simultània amb adenovirus per tal de replicar-se en cultius cel·lulars (Atchison et al., 1965). Amb els anys s'ha estudiat la seva deficiència en la replicació, i els virus que formen part d'aquest gènere s'han caracteritzat per dependre d'una co-infecció amb un virus auxiliar o *helper* (adenovirus, herpesvirus, citomegalovirus humà o virus del papil·loma) per tal de poder produir una infecció eficient (Wang et al. 2019).

Els AAV estan formats per una càpsida icosaèdrica de 20-25 nm sense embolcall lipídic, i són molt resistents a la calor, al pH àcid i a l'acció de les proteases. Tenen un genoma de DNA de cadena senzilla d'aproximadament 4.7 kb (Figura 1.10) (Samulski & Muzyczka 2014; Wang et al. 2019).

El genoma de l'AAV està flanquejat per les repeticions terminals invertides (ITRs) en els extrems i els gens *Rep* i *Cap* distribuïts en 3 marcs oberts de lectura (ORFs) diferents. Les ITRs són seqüències palindròmiques de 145 nucleòtids amb una estructura en forma de T que serveixen com a origen de replicació, senyal

d'encapsidació del genoma viral i faciliten la recombinació del genoma viral amb el genoma cel·lular hoste. El genoma codifica per a un total de 8 proteïnes classificades com a proteïnes Rep (o reguladores) necessàries per a la replicació, o proteïnes Cap (o estructurals) que formen la càpsida del virus. El control de l'expressió d'aquestes proteïnes es fa mitjançant 3 promotors diferents, el *splicing* alternatiu i una única senyal de poliadenilació (Naso et al. 2017; Pupo et al. 2022; Wang et al. 2019).

El gens *Rep* codifiquen per a 4 proteïnes: Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40, expressades sota el control dels promotors p5 i p19 i alguns d'ells pateixen *splicing* alternatiu. Les Rep78 i Rep68 són necessàries per a la replicació del genoma viral i tenen activitat endonucleasa, helicasa i ATPasa. En canvi, les Rep52 i Rep40 només tenen activitat helicasa i participen únicament en l'encapsidació del genoma viral (Büning et al. 2003; Samulski & Muzyczka 2014).

Els gens *Cap* codifiquen per a 3 proteïnes: VP1, VP2 i VP3, expressades sota el control del promotor p40 i generades també mitjançant *splicing* alternatiu. La càpsida està formada per les proteïnes VP1, VP2 i VP3 a un ràtio 1:1:10, donant lloc a una càpsida icosaèdrica de 60 subunitats. El mRNA que codifica per VP2 i VP3 conté un segon ORF que codifica per la proteïna activadora de l'assemblatge (AAP). La funció d'aquesta proteïna és facilitar l'entrada de VP3 al nucli i promoure la maduració de la càpsida (Kotterman & Schaffer 2014; Naumer et al. 2012; Xie et al. 2002).

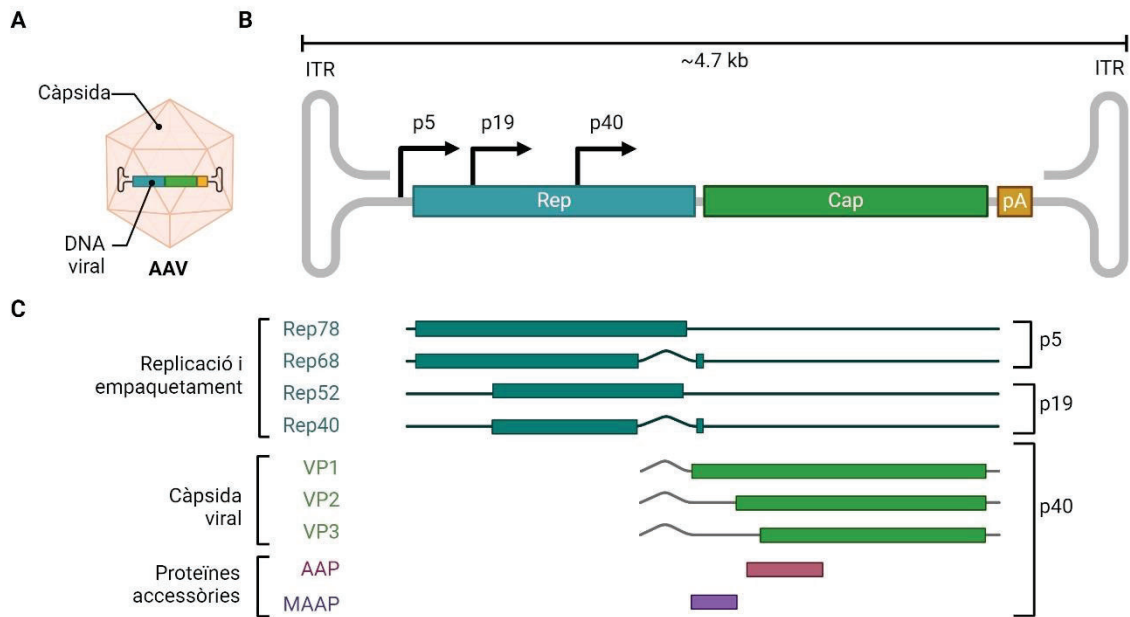


Figura 1.10. Estructura de la càpsida i genoma de l'AAV. A) Partícula del virus adenoassociat (AAV) amb el genoma monocatenari de l'AAV. B) Organització del genoma de l'AAV que inclou dues repeticions terminals invertides (ITR) que flanquegen els gens *Rep* i *Cap*, una polyA, es destaquen els promotors de l'AAV (p5, p19 i p40). C) Mapa transcripcional de les proteïnes estructurals de l'AAV (VP1, VP2 i VP3) i no estructurals (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40, AAP i MAAP). VP: proteïna viral; AAP: proteïna activadora d'assemblatge; i MAAP: proteïna AAV associada a la membrana. Figura adaptada de (Lopez-Gordo et al., 2024).

En primats s'han descrit milers de variants d'AAV, cada serotip mostra variacions en la seqüència del genoma que contribueixen en generar variabilitat en l'estructura de les proteïnes de càpsida, afinitat d'unió i interaccions a través dels receptors hoste – vector entre d'altres (Mietzsch et al., 2014). En contextos clínics i pre-clínics s'han estudiat principalment 14 d'aquestes serotips d'AAV, es resumeixen a la Taula 1.4. Cal destacar, que els diferents serotips poden tenir variabilitat de tropisme en funció de l'espècie d'hoste, l'edat i les vies d'administració del AAV (Lopez-Gordo et al. 2024; Srivastava 2016).

Taula 1.4. Comparativa dels serotips/variants de vectors AAV més comuns. Taula adaptada de (Issa et al., 2023; Lopez-Gordo et al., 2024; Pupo et al., 2022)

Serotip	Origen	Tropisme	Receptor primari	Receptor(s) secundaris
AAV1	Primat	Fetge, múscul esquelètic, SNC, cor, retina, pàncrees i vies respiratòries.	Àcid siàlic N-enllaçat i receptor AAV (AAVR).	Desconeguts.
AAV2	Humà	Fetge, múscul esquelètic, SNC, retina i ronyó.	HSPG.	FGFR1, HGFR, LamR, CD9 i integrines $\alpha\beta 5$ i $\alpha 5\beta 1$.
AAV3	Humà	Fetge, hepatocarcinoma, múscul esquelètic i oïda interna.	HSPG.	FGFR1, HGFR i LamR.
AAV4	Primat no humans	SNC, retina, pulmó i ronyó.	Àcid siàlic O-enllaçat.	Desconeguts.
AAV5	Humà	Fetge, múscul esquelètic, SNC, pulmó i retina.	Àcid siàlic N-enllaçat.	PDGFR (α i β).
AAV6	Humà	Múscul esquelètic, SNC, cor, pulmó, pàncrees i vies respiratòries.	Àcid siàlic N-enllaçat i HSPG.	EGFR.
AAV7	<i>Rhesus macaque</i>	Fetge, múscul esquelètic, SNC i retina.	Desconegut.	Desconeguts.
AAV8	<i>Rhesus macaque</i>	Fetge, múscul esquelètic, SNC, cor, pàncrees, retina, ronyó i teixit adipós.	LamR	Desconeguts.
AAV9	Humà	Fetge, múscul esquelètic, SNC, cor, pulmó, pàncrees, retina, ronyó, testicle i teixit adipós.	Galactosa N-enllaçat i AAVR.	LamR i integrina putativa.
AAV10	<i>Cynomologus monkeys</i>	Fetge i múscul	Desconegut.	Desconeguts.
AAVrh10	<i>Rhesus macaque</i>	Fetge, múscul esquelètic, SNC, cor, pulmó, pàncrees, retina i ronyó.	N-acetilactosamina sulfatada i AAVR.	Desconeguts.
AAV11	<i>Cynomologus monkeys</i>	Fetge.	Desconegut.	Desconeguts.

1.Introducció

AAV12	Primats no humans	Fetge, múscul esquelètic, SNC, cor, pulmó, pàncrees, retina i ronyó.	Manosa putativa i manosamina.	Desconeguts.
AAV13	Primats no humans	SNC.	Desconegut.	HSPG.

El mecanisme d'infecció dels AAV s'inicia quan el virus interacciona amb un receptor de glicoproteïnes de la superfície cel·lular, aquesta unió es dona en funció de l'estructura de les proteïnes de càpsida, és a dir, en funció del serotip. Aquest fet inicia el procés d'internalització mitjançant la formació de vesícules de clatrina que posteriorment s'incorporen als endosomes primerencs. El canvi de pH provocat per l'acidificació dels endosomes, per convertir-se en lisosomes, genera un canvi conformacional de les proteïna VP1 i VP2 de la càpsida, exposant-ne els seus dominis. Com a resultat, els AAV es poden escapar dels endosomes i introduir el seu genoma al nucli de la cèl·lula (Li & Samulski 2020; Wang et al. 2019).

Un cop dins del nucli, l'AAV es desencapsida i el genoma de l'AAV es sotmet a la síntesi de la doble cadena, per tal de formar la configuració bicatenària necessària per la transcripció gènica. Les ITR faciliten la recombinació per tal de generar un genoma bicatenari i circular, per tal d'assegurar l'estabilitat del genoma de l'AAV en estat episomal (Duan et al., 1998). Una proporció molt baixa, aproximadament del 10%, s'integra al genoma de la cèl·lula hoste, concretament dins d'una regió específica altament conservada del cromosoma 19 (AAVS1), degut a la homologia d'aquesta regió amb les seqüències ITR (McCarty et al., 2004). El genoma del AAV en forma episomal es manté estable a les cèl·lules postmitòtiques, i es dona la transcripció i la traducció a proteïna utilitzant la maquinària endògena cel·lular del hoste (Figura 1.11) (Li & Samulski 2020; Wang et al. 2019).

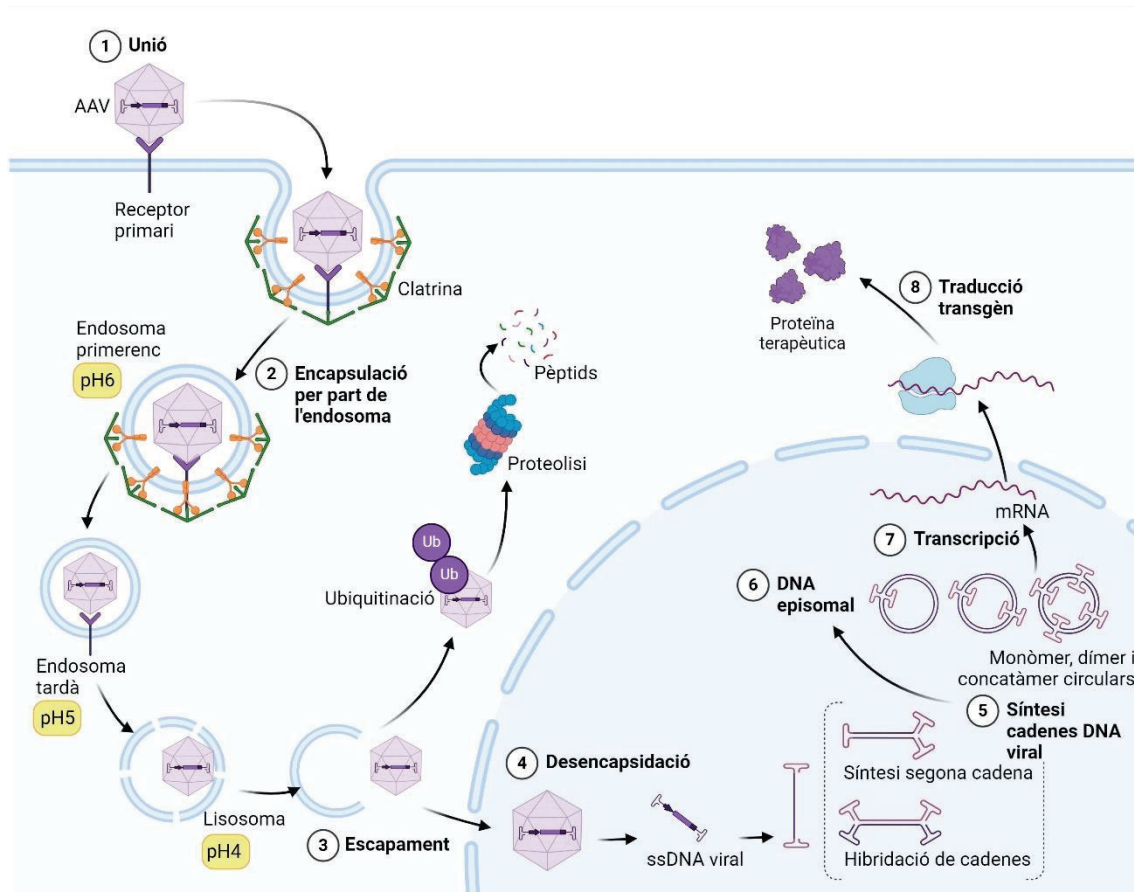


Figura 1.11. Mecanisme de transducció del AAV. 1) El virus adenoassociat (AAV) és reconegut pels receptors de superfície cel·lular i provoca la internalització del virus mitjançant endocitosi mediada per clatrina. 2) L'AAV circula pel citosol mitjançant compartiments d'endosoma i lisosoma. 3) L'AAV s'escapa de la vesícula lisosòmica, i es transporta al nucli. L'AAV també pot patir proteòlisi per part del proteosoma. 4) Al nucli, l'AAV es desencapsida. 5) A partir de la cadena simple del DNA (ssDNA) viral es genera la síntesi de la segona cadena de DNA viral. 6) Es formen els genomes episomals circulars que poden ser monòmers, dímers i concatèmers. 7) Transcripció a mRNA terapèutic. 8) Traducció al citosol de la proteïna terapèutica. Figura adaptada de Lopez-Gordo et al., 2024; D. Wang et al., 2019.

1.4.2.2. Vectors d'expressió basats en AAV recombinant

L'any 1982 Samulski i col·laboradors van ser pioners en clonar el genoma del AAV en plasmidis d'expressió, demostrant que quan aquests plasmidis eren co-transfectats en línies cel·lulars mamíferes en presència d'adenovirus, podien generar vectors vírics infecciosos (Samulski et al., 1982). Avenços posteriors en la tecnologia de l'AAV recombinant (AAVr) van revelar que era possible empaquetar un transgèn buidant essencialment el genoma de l'AAV, excepte els elements ITR, i substituint-lo per qualsevol gen i seqüències reguladores desitjades (Samulski et al., 1987).

La generació dels vectors d'expressió basats en AAVr es realitza mitjançant la substitució dels gens *Rep* i *Cap* (aproximadament el 96% del genoma viral) per un casset d'expressió d'interès amb una capacitat màxima de 5 kb. L'únic element que es manté són les seqüències ITR dels extrems, ja que són imprescindibles per l'encapsidació del genoma (Samulski & Muzyczka, 2014). Per tant, el genoma recombinant resultant pot empaquetar-se dins la càpsida, però en canvi, no podrà ni integrar-se, ni replicar-se una vegada s'hagi transduït la cèl·lula diana, ja que no presenta cap gen viral. Per fer-ho, s'haurà de seguir el sistema de triple transfecció en cèl·lules HEK293, basat en la transfecció conjunta del plasmidi amb el gen terapèutic flanquejat per les ITRs (pGen), el plasmidi que conté els gens auxiliars de l'adenovirus necessaris perquè es pugui produir el procés infectiu de l'AAV (pHelper) i el plasmidi que conté els gens virals *Rep* i *Cap* de l'AAV però sense les ITRs (pRep/Cap)(Figura 1.12)(Ayuso et al. 2010; Wang et al. 2024).

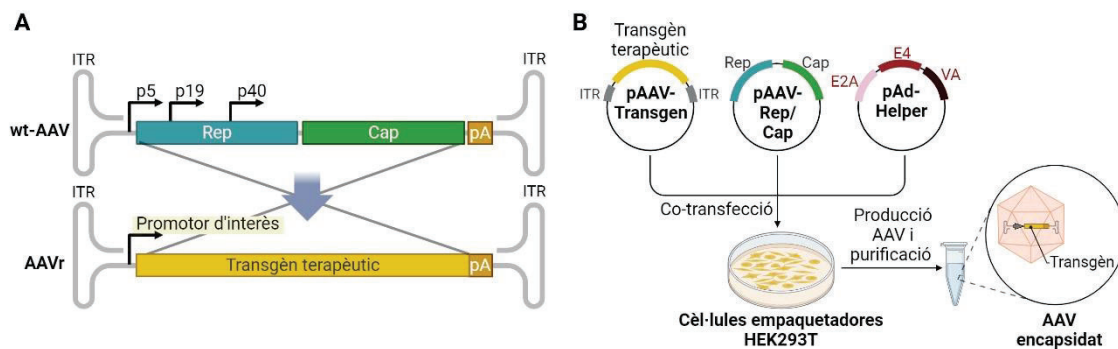


Figura 1.12. Estructura de la càpsida i genoma de l'AAV. A) Els virus adenoassociats recombinants (AAVr) es generen substituint el genoma viral (*Rep*, *Cap*) per un transgèn terapèutic i promotor d'interès. B) La producció de vectors AAV es basa en la triple transfecció de tres plasmidis: el pAAV-Transgen que conté el transgèn terapèutic, el pAAV-Rep/Cap que conté les proteïnes virals *Rep* i *Cap*, i el pAd-Helper virus auxiliar que conté gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAV. Figura adaptada de Kang et al., 2023; Li & Samulski, 2020; Wang et al., 2024.

El plasmidi amb la seqüència terapèutica conté per una part les ITR i per l'altra el casset d'expressió d'una capacitat màxima de 5kb. Generalment, en el camp de la teràpia gènica s'utilitzen les ITR que pertanyen al AAV2, ja que és el serotip més ben caracteritzat. Pel que fa al casset d'expressió, aquest està format per un promotor, el gen o la seva seqüència codificant i la senyal de poliadenilació (poliA). La selecció del promotor és un altre factor clau que influeix en l'expressió del transgèn de l'AAVr. Els promotors es seleccionen i optimitzen mitjançant estratègies d'enginyeria, per tal que siguin teixit o cèl·lules específics o regular-ne el seu nivell d'expressió, fins i tot fent que la seva activació sigui induïble mitjançant l'exposició a molècules

específiques. Pel que fa a l'estructura de la càpsida, segons quin sigui el tropisme tissular d'interès, s'utilitzen els plasmidis que continguin els gens *Cap* de cadascun dels serotips (Issa et al. 2023; Wang et al. 2024).

En conjunt, la co-transfecció dels tres plasmidis permet que el constructe d'interès flanquejat per les ITRs es repliqui i les molècules resultants de DNA entrin a les càpsides pre-formades dels AAV. Finalment, les partícules virals resultants es purifiquen del lisat cel·lular mitjançant una centrifugació amb gradient de densitat i/o cromatografia en columna (Li & Samulski 2020).

En la teràpia gènica clínica, els AAV recombinants han sorgit com una eina de lliurament fonamental a causa de la seva mínima patogenicitat i de la capacitat d'establir una expressió gènica a llarg termini en diferents teixits. Fins la data, set productes de teràpia gènica basats en AAVr han rebut l'aprovació per part de les agències reguladores (FDA, EMA o SFDA). Tanmateix, encara hi ha preocupacions sobre la limitació de la capacitat de càrrega, l'ús segur de teràpies virals a dosis altes en humans, l'activació de respostes immunitàries i efectes adversos com ara genotoxicitat, hepatotoxicitat i neurotoxicitat entre d'altres (Wang et al. 2024).

1.4.3. Transferència gènica al sistema nerviós central

Els trastorns del sistema nerviós central (SNC), inclosos els trastorns monogènics i multifactorials, comprenen una part important de la discapacitat en MMH. Els AAV són els vectors més utilitzats per aconseguir la transducció eficient al SNC, actualment hi ha nombrosos assajos clínics basats en aquesta teràpia gènica (Piguet et al., 2017). Tanmateix, l'eficiència de la transferència gènica al SNC està limitada a causa de l'efecte protector de la barrera hematoencefàlica (BHE), segueix sent un repte important per a una aplicació més clínica de la teràpia gènica amb AAV (Ghauri & Ou 2023; Kimura & Harashima 2020).

Un dels factors que pot influenciar en millorar l'eficiència de transducció al SNC mitjançant la teràpia gènica, és la via d'administració. Aquesta es pot diferenciar entre l'administració sistèmica i la local, així com l'edat d'administració (Figura 1.13), l'elecció d'una o altra dependrà en gran mesura de les característiques de la

malaltia, els teixits diana i l'eficiència de transducció de la càpsida del AAVr (Ling et al. 2023).

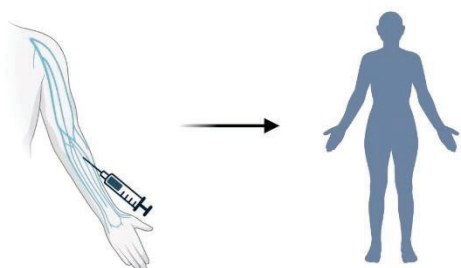
L'administració sistèmica per via intravenosa (IV) amb certs serotips d'AAVr permet una transducció moderada al SNC d'una forma poc invasiva. Malgrat això, l'eficiència de biodistribució al SNC de gran part dels serotips d'AAV naturals és limitada, degut al gran tropisme de les partícules virals cap al fetge, i a l'efecte protector de la BHE que no permet travessar-la. Així doncs, per tal d'assolir una bona transducció al SNC amb l'administració sistèmica de AAVr es requereix grans dosis de vectors, augmentant el risc associat a una resposta immune per part de l'hoste (Deverman et al., 2018; Stanton et al., 2023; Zhou et al., 2024). Cal destacar l'existència d'un producte aprovat per la FDA per a l'atròfia muscular espinal, basat en l'administració intravenosa d'un AAV9 (Mendell et al. 2017).

L'administració local dels AAV a SNC requereix procediments invasius, no obstant, les vies utilitzades ja han estat aprovades i validades en la clínica. Les vies més utilitzades són els que permeten l'administració directa al parènkima cerebral (IP) o al líquid cefalorraquidi (CSF, per les seves sigles en anglès). L'administració intraparenquimal (IP) s'utilitza principalment per assolir la biodistribució local del transgèn terapèutic en una sola regió determinada del SNC, com podrien ser l'estriat, el tàlem, el putamen i la substància blanca entre d'altres. El principal avantatge d'aquesta via d'administració és la mínima difusió de l'AAV cap als òrgans perifèrics, fet que redueix la possible immunogenicitat i efectes secundaris a altres teixits. A més, les dosis dels vectors administrats són substancialment inferiors a les necessàries per arribar als teixits diana en el cas altres vies d'administració (Deverman et al. 2018; Kang et al. 2023; Ling et al. 2023).

La via intra- CSF permet transduir varies zones del SNC amb una sola administració del vector ja que els vectors són alliberats directament al CSF, i aquest arriba tant a les parts internes com externes de l'encèfal i a la medul·la espinal. Les diferents estratègies d'injecció de l'AAV terapèutic que s'han estudiat per tal de distribuir al CSF d'una manera generalitzada són: la injecció intracerebroventricular (ICV), la intracisterna magna (ICM) i la intratecal (IT). L'administració directament al CSF permet eludir la BHE, permetent el lliurament d'un nombre òptim de còpies

transgèniques al SNC i reduint-ne la difusió de partícules virals a òrgans perifèrics com el fetge (Daci & Flotte, 2024; Kang et al., 2023; Ling et al., 2023). En estudis comparatius de les tres estratègies, s'ha destacat que l'administració via ICM aconsegueix un lliurament generalitzat del transgens tant al cervell com a la medul·la espinal, mentre que la ICV i IT s'adrecen únicament al cervell i a la medul·la espinal respectivament. A més, en relació a l'administració IV el lliurament d'ICM requereix dosis virals més petites en comparació amb el lliurament sistèmic, millorant-ne la seguretat i reduint els costos de fabricació de vectors de grau clínic (Daci & Flotte 2024; Hinderer et al. 2014; Marchi et al. 2022).

A. Administració intravenosa

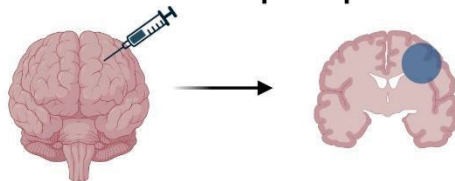


- Tractament sistèmic
- Mínimament invasiu



- La càpsida ha de creuar la BHE.
- Dosi més alta per arribar al SNC.
- Augmenta el risc a immunogenicitat.
- Distribució a òrgans perifèrics.

B. Administració intraparenquimal

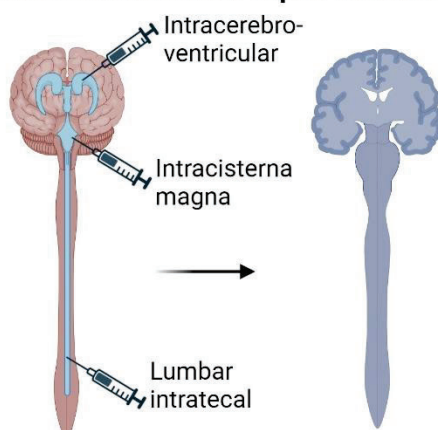


- Mínima distribució a òrgans perifèrics.
- Creua la BHE.
- Dosi moderada per arribar al SNC.



- Invasiu.
- Requereix de múltiples administracions a diferents regions.
- Distribució limitada pot reduir l'eficàcia terapèutica.

C. Administració intra-líquid cefalorraquídi (CSF)



- Mínima distribució a òrgans perifèrics.
- Creua la BHE.
- Àmplia distribució al SNC.
- Dosi moderada per arribar al SNC.



- Invasiu.
- L'eficiència de transducció depèn de la càpsida i la via d'administració.

Figura 1.13. Vies d'administració de teràpia gènica *in vivo* per la transducció al sistema nerviós central (SNC). Representació de les vies d'administració, la biodistribució del vector (indicada per l'ombregjat blau) i els diferents pros i contres. A) Via intravenosa, permet la circulació del vector terapèutic per tot el cos de forma sistèmica. B) L'administració intraparenquimal (IP) lliura directament el vector terapèutic a regions específiques del cervell. C) L'administració de líquid intra-cefalorraquídi (intra-CSF) pot fer-se per via intracerebroventricular (ICV), intracisterna magna (ICM) o intratecal lumbar intratecal (IT). BHB, barrera hematoencefàlica; SNC, sistema nerviós central. Figura adaptada de Kang et al., 2023; Ling et al., 2023.

En el context d'aquesta tesi, s'ha desenvolupat una estratègia terapèutica basada en l'administració d'un vector terapèutic AAV9, explorant dues vies d'administració: intravenosa i ICM, per aconseguir la inhibició del primer enzim de la via catabòlica de la lisina, l'enzim alfa-aminoadípíic semialdehid sintasa (AASS), com a eina terapèutica per a l'AG1.

2.HIPÒTESI I OBJECTIUS

L'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1) és una malaltia metabòlica hereditària amb un fenotip neurològic sever causat per la deficiència de glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH), enzim de la via del catabolisme de la lisina. Actualment, tot i que es realitza un diagnòstic i s'aplica un tractament dietètic precoç, un terç dels pacients pateixen discapacitats neurològiques a llarg termini, evidenciant la necessitat de noves estratègies terapèutiques eficients per l'AG1. Les teràpies de reducció de substrat han sorgit com a potencials aproximacions terapèutiques per a trastorns innats del metabolisme. Aquestes actuen disminuint els nivells de metabòlits tòxics mitjançant la inhibició d'un enzim anterior de la mateixa via de l'enzim deficient.

La hipòtesi d'aquesta tesi doctoral és que la inhibició del catabolisme de la lisina, concretament del primer enzim d'aquesta via, l'alfa-aminoadípíc semialdehid sintasa (AASS), pot esdevenir una estratègia terapèutica per a l'AG1.

L'objectiu general ha estat el desenvolupament d'una estratègia de teràpia gènica per a l'AG1 basada en la inhibició de l'enzim AASS mitjançant interferència de l'RNA (iRNA, per les seves sigles en anglès). En aquest estudi s'ha treballat amb ratolins *Gcdh*^{-/-} com a model de l'AG1 per avaluar el potencial del vector terapèutic basat en un virus adenoassociat 9 (AAV9) que conté un microARN artificial (miRNA) dirigit al transcrit de l'*Aass*.

S'han plantejat els següents objectius específics:

1. Dissenyar i identificar seqüències de miRNA capaces de silenciar l'AASS *in vitro*.
2. Avaluar la via d'administració, la biodistribució del vector AAV9_miR_AASS i l'eficiència del silenciament de l'AASS en ratolins *Gcdh*^{-/-}.
3. Estudiar l'eficàcia terapèutica del vector AAV9_miR_AASS en ratolins *Gcdh*^{-/-} en un context d'exposició a dieta alta en lisina, condició amb la que s'observa el fenotip clínic característic dels pacients amb AG1 en aquest model.

3.MATERIALS I MÈTODES

3.1. Manipulació del DNA

3.1.1. Aïllament de DNA

3.1.1.1. Aïllament de DNA plasmídic de cèl·lules procariotes

En aquest treball s'han generat diferents plasmidis que incorporen les seqüències de miRNA (miR_AASS) i plasmidis que contenen les seqüències de cDNA de AASS humà i Aass murí, veure l'*apartat 3.1.4.5*. L'aïllament del DNA plasmídic es va fer mitjançant una tècnica de precipitació de DNA a partir d'un lisat bacterià en presència de sals i isopropanol. Les colònies bacterianes que contenen el plasmidi d'interès, es van inocular en un medi *Luria-Bertani* (LB) suplementat amb l'antibiòtic de selecció d'interès. El cultiu es va incubar en agitació a 37°C, fins a la saturació (aproximadament 16-20h).

En funció del volum inicial de cultiu bacterià, l'aïllament del DNA es va fer mitjançant un mètode a petita o gran escala, anomenats *Minipreps* o *Maxipreps* respectivament.

3.1.1.1.1. Aïllament de DNA plasmídic a petita escala

Minipreps és un procediment d'aïllament del DNA a petita escala, del qual s'obté entre 25 a 50 µg de DNA plasmídic, a partir de 5 mL d'un cultiu bacterià d'interès.

El sediment cel·lular es va aïllar per centrifugació (6000 g) durant 5 min. Les cèl·lules es van ressuspèndre amb un tampó isotònic en presència de RNasa A (Tampó P1, Taula 3.1), i posteriorment es van lisar a temperatura ambient amb una solució alcalina en presència de SDS (Tampó P2, Taula 3.1). Transcorreguts 5 min, la reacció de lisis es va neutralitzar per l'addició d'un tampó acídic (Tampó P3, Taula 3.1) i la incubació durant 20 min en gel. Les restes cel·lulars no desitjades, proteïnes i DNA cromosòmic, es van separar per centrifugació (1500 g) durant 10 min.

A continuació, el DNA plasmídic que es trobava a la fracció aquosa, es va precipitar amb isopropanol i rentar amb etanol 70%. El plasmidi es va ressuspèndre amb 50 µL d'aigua lliure de nucleases i es va conservar a -20 °C.

Taula 3.1. Protocol preparació tampons aïllament DNA plasmídic.

Tampó P1 (pH 8)		Tampó P2		Tampó S3 (pH 5.5)	
Tris	50 mM	NaOH	0.1 M	Acetat potàsic	1,5 mM
EDTA	10 mM	SDS	1%	Àcid acètic	pH ajustat

3.1.1.1.2. Aïllament de DNA plasmídic a gran escala

Maxipreps és un procediment d'aïllament de DNA a gran escala, del qual s'obté entre 100 a 2000 µg de DNA plasmídic, a partir de 250-500mL d'un cultiu bacterià d'interès.

L'aïllament de DNA a gran escala es va realitzar de manera estandarditzada seguint el kit comercial de *Maxiprep* per a la filtració de plasmidis *PureLink™ HiPure* (Invitrogen – ref. A31233). Aquest protocol segueix els mateixos principis descrits a l'apartat anterior. Per obtenir una major puresa, el kit compta amb una columna de sílice d'intercanvi iònic, la qual permet la retenció de DNA plasmídic a la matriu, mentre que aquells components no desitjats (restes cel·lulars, proteïnes, RNA, etc...) són eliminats. El DNA plasmídic es va eluir de la columna amb una solució salina, precipitar amb isopropanol, i rentar amb etanol 70%. El plasmidi es va resuspendre amb 100 µL d'aigua lliure de nucleases i es va conservar a -20 °C.

3.1.1.2. Aïllament de DNA total de cèl·lules eucariotes

L'aïllament de DNA total (incloent genòmic i plasmídic) provinent de cultiu cel·lular, es va fer utilitzant el kit comercial *Blood DNA Isolation Mini Kit* (Norgen – ref. 46380), basat en els principis de retenció en columna de sílice.

El sediment cel·lular es va aïllar per centrifugació (1200 g) durant 5 minuts. Les cèl·lules es van ressuspendre amb tampó fosfat salí (PBS, de les seves sigles en anglès) en presència de proteïnasa K, i posteriorment es va lisar a 55 °C amb una solució de lisis comercial. Transcorreguts 10 minuts, la reacció de lisis es va neutralitzar per l'addició d'etanol 100%, el contingut es va traspasar a una columna. Mitjançant el pas de solucions salines comercials, es van eliminar els components a descartar, mentre que el DNA es va mantenir unit a la matriu. El DNA es va eluir amb 50 µL del tampó d'elució comercial i es va conservar a -20 °C.

3.1.2. Quantificació del DNA

La quantificació i puresa del DNA es van determinar mitjançant la mesura de l'absorbància de la mostra quan aquesta s'excitava a 260 nm. D'acord amb la llei de Lambert-Beer ($0.020 \text{ (}\mu\text{g/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i considerant que els àcids nucleics (nucleòtids, RNA, ssDNA i dsDNA) absorbeixen a 260 nm, la mesura de l'absorbància a aquesta longitud d'ona determina la concentració del DNA. Les determinacions es van fer utilitzant l'espectrofotòmetre *Nanodrop*TM (Thermo Scientific).

La proporció de les absorbàncies mesurades a 260/280 nm, ens va permetre avaluar la puresa dels àcids nucleics. Una proporció al voltant de 1,8 és generalment acceptada com a DNA "pur". Si la proporció és menor, és indicatiu que a la mostra hi ha presència de proteïnes, solvents orgànics o altres contaminants que presenten absorbància a 280 nm.

A més, la proporció de les absorbàncies mesurades a 260/230 nm, es va utilitzar com a mesura addicional de la puresa dels àcids nucleics. La proporció que indica una puresa òptima es troba entre 2.0 i 2.2. Així doncs, proporcions més baixes, determinen la presència de sals o altres contaminants que es detecten a 230 nm.

3.1.3. Amplificació del DNA

3.1.3.1. Reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction* (PCR) permet l'amplificació *in vitro* de fragments específics de DNA. Aquesta reacció es basa en l'activitat enzimàtica de la polimerasa *Thermophilus aquaticus* (Taq polimerasa), que copia cadenes de DNA mitjançant la incorporació de desoxiribonucleòtids (dNTPs).

L'especificitat de la reacció ve donada per l'ús d'encebadors que reconeixen la cadena motlle de DNA i alhora serveixen de punt de partida a la polimerasa. Els encebadors són cadenes de 20-25 nucleòtids complementàries als extrems 3' de la regió a amplificar. Aquestes seqüències han de ser úniques en el genoma i han de tenir certes característiques termodinàmiques, per evitar inespecificitats i la formació d'estructures secundàries respectivament. Per tal de realitzar un disseny

òptim d'encebadors i calcular la temperatura teòrica d'hibridació, es va utilitzar el software Primer3. Veure els encebadors utilitzats a l'*Annex Taula 8.1*.

La reacció (Taula 3.2) es fa en presència d'un tampó enzimàtic suplementat amb magnesi i segueix tres fases (desnaturalització, hibridació i elongació) que es repeteixen cíclicament i de forma automatitzada entre 25 i 40 vegades per amplificar exponencialment el DNA d'interès. Tots els processos de PCR del present treball es van dur a terme usant la *DreamTaq DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific – ref. EP0702) i el termociclador *ABI 2720* (Applied Biosystems) utilitzant les condicions que s'especifiquen a la taula (Taula 3.3).

Taula 3.2. Protocol reacció PCR.

Reacció PCR (20 µL)	
DNA	1 µg
Tampó PCR 10x	2 µL
dNTPs (1.25 mM)	2 µL
Encebador <i>forward</i> (10 uM)	1 µL
Encebador <i>reverse</i> (10 uM)	1 µL
Polimerasa <i>DreamTaq</i> (5 U/µL)	0.125 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 20 µL

Taula 3.3. Protocol condicions PCR.

Condicions PCR			
Pas	Cicles	Temperatura	Temps
Desnaturalització inicial	1	94 °C	5 min
Desnaturalització		94 °C	30 s
Hibridació	35	T° hibridació	30 s
Extensió		72 °C	1 min/1kb
Extensió final	1	72 °C	5 min
Conservació	1	4 °C	∞

3.1.3.2. Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa

La reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR) es basa en el mateix principi que la PCR, però té la capacitat de controlar el progrés de la PCR conforme es produeix (és a dir, en temps real) i permet determinar la quantitat d'una seqüència específica de DNA gràcies a un fluoròfor. Aquest fluoròfor s'intercala entre les cadenes de DNA que conformen la doble hèlix, emetent fluorescència. A mesura que avança la reacció, els nivells de fluorescència augmenten subseqüentment a l'amplificació de molècules de DNA on el fluoròfor es pot intercalar. Les reaccions es caracteritzen pel punt en el temps durant el ciclat en el qual es detecta per primera vegada l'amplificació d'una molècula en lloc de la quantitat de molècula acumulada després d'un nombre fix de cicles. Com més gran sigui el nombre de còpies d'inici de les molècules d'àcid nucleic, abans s'observarà un augment significatiu de la fluorescència. La quantificació es basa en la determinació del cicle de PCR en què el nivell de fluorescència supera un llindar determinat.

Les reaccions de qPCR (Taula 3.4) es van dur a terme utilitzant els encebadors especificats a l'Annex Taula 8.1, amb el reactiu comercial *LightCycler® 480 SYBR Green I Màster* (Roche - ref. 04707516001) i el termociclador *QuantStudio 7* (Applied Biosystems) tal com es detalla a continuació (Taula 3.5):

Taula 3.4. Protocol reacció qPCR.

Reacció qPCR (10 µL)	
DNA o cDNA	1 µL
Tampó <i>SYBR Green</i> 2X	5 µL
Mix encebadors 10 µM	0.7 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 10 µL

Taula 3.5. Protocol condicions qPCR.

Condicions qPCR			
Pas	Cicles	Temperatura	Temps
Desnaturalització inicial	1	95 °C	5 min
Desnaturalització		95 °C	10 s
Hibridació	40	T° hibridació	30 s
Extensió		72 °C	20 s
Extensió final	1	72 °C	10 min

3.1.4. Tècniques de clonatge

3.1.4.1. Digestió enzimàtica

EL DNA és susceptible a ser tallat per enzims de restricció en llocs específics de la seva seqüència. Aquests enzims són capaços de reconèixer seqüències concretes de nucleòtids de DNA i trencar els enllaços fosfodièster de doble cadena d'aquests punts específics, deixant així extrems roms o cohesius en funció del enzim que s'utilitza.

Les digestions es van realitzar incubant el DNA en presència de l'enzim corresponent a 37°C durant 1-16h, i amb el tampó enzimàtic indicat per la casa comercial en cada cas utilitzant les següents condicions (Taula 3.6, 3.7):

Taula 3.6. Protocol reacció restricció enzimàtica.

Reacció restricció enzimàtica (20 µL)	
DNA plasmídic	1-5 µg
Tampó enzim de restricció (10X)	2 µL
Enzim de restricció (10 U/µL)	1 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 20 µL

Taula 3.7. Recopilació enzims de restricció utilitzats.

Enzims de restricció			
Enzim	Tampó	Casa comercial	Referència
HindIII	Tampó R	Thermo Fisher Scientific	ER0501
NotI	Tampó O	Thermo Fisher Scientific	ER0591
XhoI	Tampó R	Roche	24574820

Posteriorment, els enzims de restricció es van inactivar seguint les instruccions de la casa comercial, usualment a 65°C durant 20 min.

Els productes digerits es van analitzar mitjançant electroforesi en gels d'agarosa del 0,8-2%, en funció de la mida del producte que volíem estudiar. El patró de bandes obtingut va determinar si la reacció s'havia donat correctament o no. En el cas que el fragment es necessités per a altres tècniques, el DNA era recuperat mitjançant el kit comercial d'extracció de DNA en gel d'agarosa *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen – ref. 28704).

3.1.4.2. Desfosforilació extrem 5'

El producte de digestió enzimàtica linealitzat és susceptible a patir una re-l·ligació. Per tal d'evitar-ho, es va dur a terme un tractament de desfosforilació dels extrems 5' de la seqüència.

La desfosforilació es va dur a terme mitjançant el producte comercial *Phosphatase alkaline* (PA) (Roche – ref. P0114-10KU). La reacció es va realitzar incubant el producte de la digestió amb la fosfatasa alcalina a 37°C durant 1h com s'especifica a continuació (Taula 3.9):

Taula 3.8. Protocol reacció desfosforilació 5'

Reacció desfosforilació 5' (30 µL)	
Fragment de DNA digerit	20 µL
Tampó fosfatasa alcalina	3 µL
Fosfatasa alcalina (1 U/µL)	1,5 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 30 µL

Finalment, es va inactivar l'activitat enzimàtica incubant la reacció a 65°C durant 15 min.

3.1.4.3. Clonatge d'insert a vector

Per tal de realitzar el clonatge d'un o més fragments de DNA en un vector de manera ràpida i dirigida, es va utilitzar una estratègia de clonatge comercial anomenada *In-Fusion HD Cloning Plus CE* (Takara Biosciences- ref. 638916).

Aquesta tecnologia innovadora treballa a partir d'un vector linealitzat i un fragment a inserir. L'insert conté 15 parells de bases flanquejant als dos extrems 3' i 5', els quals són homòlegs als extrems del vector (Figura 3.1). L'especificitat de la reacció ve donada pels nucleòtids d'homologia que contenen, tant el vector linealitzat com el fragment, als seus extrems.

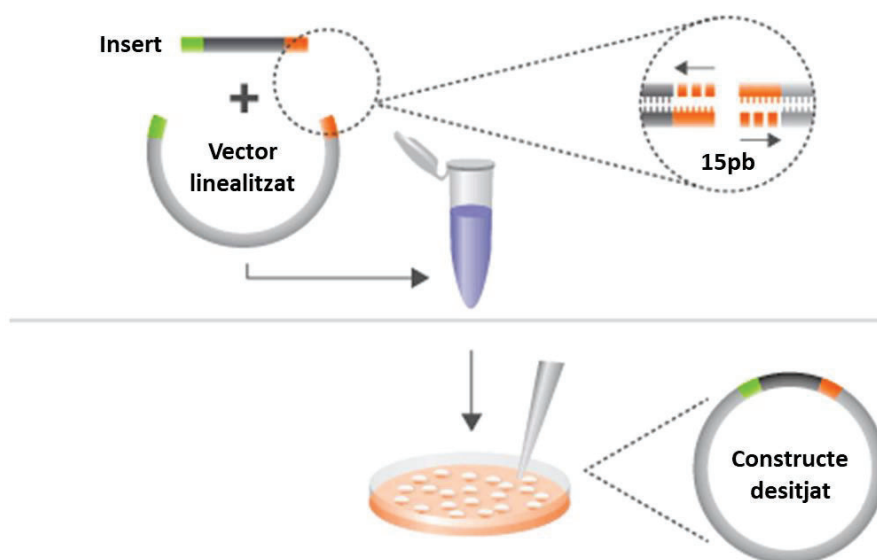


Figura 3.1. Esquema de la tecnologia d'*In-Fusion*.

La reacció es va fer en presència de l'*In-Fusion Enzyme Premix* comercial, la qual es va incubar a 50 °C durant 15 minuts per tal de generar el producte utilitzant les següents condicions (Taula 3.10):

Taula 3.10. Protocol reacció de clonatge *In-Fusion*.

Reacció de clonatge <i>In-Fusion</i> (10 µL)	
In-Fusion HD Enzyme Premix 5X	2 µL
Vector linealitzat	167 ng
Insert	33 ng
Potenciador del clonatge	1 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 10 µL

Per obtenir una eficiència de clonatge més alta, en la reacció es van utilitzar 200ng de DNA de vector i insert, mantenint una proporció de concentracions de 4:1 entre l'insert i el vector.

Finalment, el constructe resultant es va introduir a cèl·lules *E.coli* competents comercials que contenia el kit, *Stellar Competent Cells* mitjançant transformació bacteriana. Aquest procés es va realitzar incubant en gel els bacteris juntament amb el DNA plasmídic durant 30 min. Transcorregut aquest temps, els bacteris es van sotmetre a un xoc tèrmic a 42°C durant 20 s, seguit d'una incubació durant 2 min en gel. Per tal de recuperar el cultiu, aquest es va incubar en agitació a 37 °C durant 1 h en un medi ric en nutrients. Després, aquest es va sembrar en plaques de LB-agar amb l'antibiòtic corresponent per tal de seleccionar els bacteris transfectats.

3.1.4.4. Seqüenciació de DNA

La seqüenciació de fragments de DNA es va realitzar mitjançant el mètode de Sanger. Aquest mètode es basa en una reacció de PCR en la qual s'incorporen de manera aleatòria dideoxinucleòtids marcats amb fluoròfors específics per a cadascuna de les bases nucleotídiques, i sense el grup hidroxil al carboni 3'. La incorporació d'un d'aquests dideoxinucleòtids impedeix que la polimerització continuï. Això porta a generar un conjunt de fragments de DNA de diferents mides, acabats en cadascuna de les bases de la seqüència d'interès. Mitjançant la detecció de fluorescència de l'últim dideoxinucleòtid de cada fragment, s'obté la seqüència nucleotídica del fragment de DNA d'interès.

Les seqüenciacions de DNA es van realitzar pel servei de seqüenciació de l'empresa *Eurofins Genomics*. Als quals se'ls va enviar les mostres de DNA i els encebadors corresponents en les condicions requerides per l'empresa.

3.1.4.5. Generació de constructes plasmídics

3.1.4.5.1. Generació dels pmiR_AASS

En aquest treball es van generar quatre plasmidis: pmiR_1, pmiR_2, pmiR_3, pmiR_4, i pmiR_4-Sc. Cada plasmidi contenia una seqüència pri-miR_AASS d'estudi, i el pmiR_4-Sc la seqüència pmiR_4 amb els nucleòtids de les seqüències guia i passatgera desordenats.

Les seqüències miR_AASS es van adquirir en format de gBlock® *Gene Fragment* a través de *Integrated DNA Technologies* (IDT), amb la seqüència respectiva flanquejada per 15pb homòlegs als extrems del vector linealitzat; veure les seqüències l'*Annex Taula 8.2*. Per altra banda, es va linealitzar el vector p_AAV_CA (Addgene – ref. 69616) mitjançant la digestió amb l'enzim de restricció HindIII i es va sotmetre el producte a un tractament de desfosforil·lació, veure l'*apartat 3.1.4.1* i *3.1.4.2* respectivament. A continuació, les seqüències miR_AASS es van clonar mitjançant la tecnologia d'*In-Fusion* al vector p_AAV_CA, veure l'*apartat 3.1.4.3* (Figura 3.2).

Es van transformar les cèl·lules *Stellar Competent Cells* i les seqüències van ser comprovades mitjançant amplificació del DNA i seqüenciació tal com s'especifica a l'*apartat 3.1.3.1* i *3.1.4.4* respectivament.

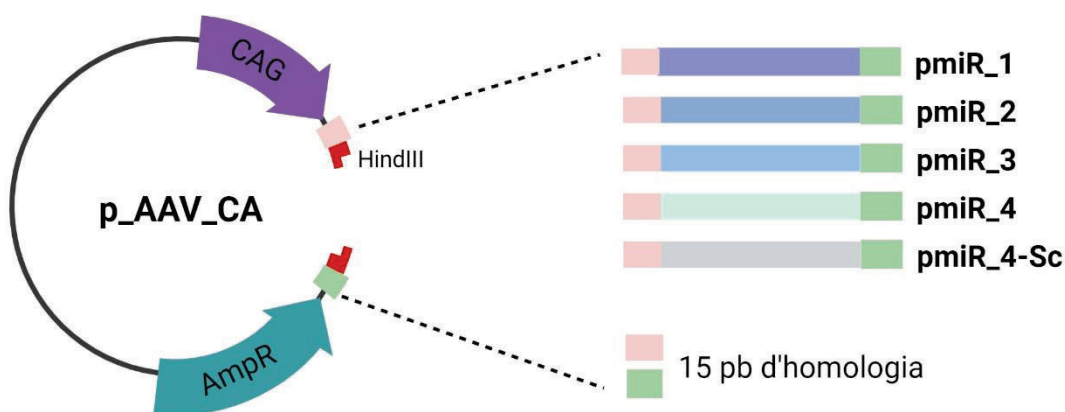


Figura 3.2. Esquema representatiu del procés de construcció dels p_AAV_miR_AASS.

3.1.4.5.2. Generació dels psiCHECK-2_AASS

Per tal de realitzar estudis *in vitro* de l'eficiència de silenciament de les seqüències miR_AASS, es van generar els plasmidis psiCHECK-2_AASS_Humà i psiCHECK-2_AASS_Ratolí.

Les seqüències AASS_Humà i Aass_Ratolí contenen les regions de cDNA del AASS humà i de ratolí respectivament, i es van adquirir en format de gBlock® *Gene Fragment*. Ambdues seqüències es van generar amb 15pb homòlegs als extrems del vector linealitzat; veure les seqüències l'Annex Taula 8.3. Per altra banda, es va linealitzar el vector psiCHECK-2 (Promega – ref. C8021) mitjançant la digestió amb l'enzim de restricció NotI i XhoI, i es va sotmetre el producte a un tractament de desfosforil·lació, veure l'apartat 3.1.4.1 i 3.1.4.2 respectivament. A continuació, les seqüències AASS_Humà i Aass_Ratolí es van clonar mitjançant la tecnologia d'*In-Fusion* al vector psiCHECK2, veure l'apartat 3.1.4.3 (Figura 3.3).

Es van transformar les cèl·lules *Stellar Competent Cells* i les seqüències van ser comprovades mitjançant amplificació del DNA i seqüenciació, veure l'apartat 3.1.3.1 i 3.1.4.4 respectivament.

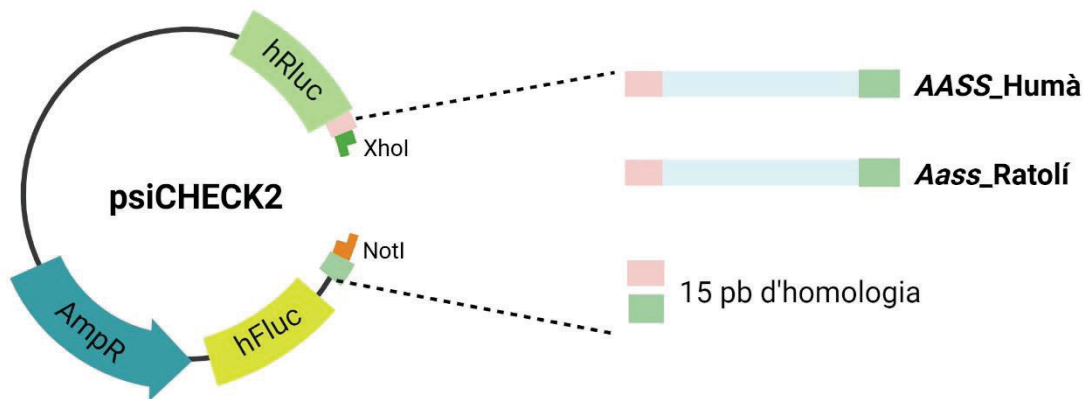


Figura 3.3. Esquema representatiu del procés de construcció dels psiCHECK2_AASS.

3.1.5. Producció, purificació i titulació d'AAV

La producció dels diferents vectors virals AAV9s es va realitzar mitjançant el protocol de triple transfecció de plasmidis en cèl·lules empaquetadores HEK-293.

Els tres plasmidis utilitzats van ser: en primer lloc el plasmidi d'interès, p_AAV_miR_AASS o p_AAV_miR_Sc, el qual inclou el transgen a expressar flanquejat

per les regions ITR. En segon lloc, un plasmidi accessori pRep2Cap9, el qual codifica per a les proteïnes de la càpsida proteica i les proteïnes necessàries per a la replicació viral. I finalment, un plasmidi pAdHelper que codifica per a les proteïnes adenovirals auxiliars necessàries. Transcorregudes 72h després de la transfecció, es va realitzar la recollida i purificació dels vectors AAV mitjançant ultracentrifugacions en gradient de CsCl.

Per tal de titular els genomes virals, es van lissar les càpsides per obtenir el DNA i es va quantificar, veure l'*apartat 3.1.2*.

Pel que fa als AAV9_miR_AASS i AAV9_miR_Sc el procés de producció, purificació i titulació d'AAV es va dur a terme per part de la Unitat de Producció de Virus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

L'AAV9_p31_miR_AASS, que es tracta d'un AAV9 modificat, es va produir, purificar i titular en el marc d'una col·laboració científica amb el grup de Teràpia Gènica en Malalties Hepàtiques, de la Universidad de Navarra - CIMA.

Les titulacions obtingudes dels diferents vector van ser (Taula 3.11):

Taula 3.11. Recopil·lació titulació vectors virals utilitzats.

Titulació vectors virals	
AAV_miR_AASS	1,23 x 10 ¹³ gv/mL
AAV_miR_Sc	1,04 x 10 ¹³ gv/mL
AAV9_p31_miR_AASS	2,15 x 10 ¹² gv/mL

3.2. Manipulació del RNA

3.2.1. Aïllament de RNA

L'aïllament de RNA total (incloent també microRNA), provinent tant de cultius cel·lulars com de mostres de teixit, es va fer utilitzant el kit comercial *miRNeasy® Mini Kit* (Qiagen – ref. 217004). Seguint un protocol basat en l'aïllament per cloroform i la posterior retenció a una columna de sílice.

Els sediments de cultius cel·lulars o bé d'homogenats de teixit es van lisar amb una solució a base de guanidina-tiocianat (*Qiazol Lysis Reagent*). A continuació, es va afegir cloroform i es va barrejar per inversió, generant una fase aquosa i una d'orgànica. Proteïnes, lípids i DNA (a pH àcid 4-6) es van quedar a la fase orgànica (inferior), mentre que el RNA va romandre a la fase aquosa (superior). Aquesta última, es va traspasar a una columna de sílice, la qual mantenia retint les molècules de RNA. Després de la realització de diversos rentats, es va eluir el RNA amb aigua lliure de nucleases, i es va conservar a -80 °C.

3.2.2. Quantificació de RNA

La quantificació de RNA es va realitzar mitjançant la mesura d'absorbància a 260nm i posterior aplicació de la Llei de Lambert-Beer, tal i com s'ha descrit a l'*apartat 3.1.2*.

La relació d'absorbància 260/280 es va tenir en compte per avaluar el nivell de puresa de la mostra. Una relació de 2 es considera òptima, mentre que valors inferiors denoten contaminació per DNA, proteïnes o solvents.

Les determinacions es van fer utilitzant l'espectrofotòmetre *Nanodrop™* (Thermo Scientific).

3.2.3. Anàlisi de l'expressió del RNA missatger

L'anàlisi de RNA missatger (mRNA) cel·lular es va dur a terme mitjançant qPCR. Degut a que la polimerasa emprada a la qPCR no és capaç de reconèixer les molècules de RNA com a motlle, les mostres de RNA es van sotmetre a un protocol de transcripció inversa a DNA.

La reacció de retrotranscripció (Taula 3.12) genera una seqüència de DNA bicatenaria complementaria (cDNA) als mRNA presents a la mostra. La reacció es va realitzar fent servir el kit comercial *PrimeScript RT-PCR Kit* (Takara – ref. RR014B). El kit utilitza la transcriptasa inversa del virus de la leucèmia murina Moloney (MMLV-RT) juntament amb encebadors de 6 parells de bases aleatòries (Random 6 mers) i encebadors OligodT complementaris a la cua polyA per dur a terme la reacció de retrotranscripció detallada a continuació (Taula 3.13):

Taula 3.12. Protocol reacció transcripció inversa del mRNA.

Reacció transcripció inversa del mRNA (10 µL)	
RNA	500 ng
Tampó <i>PrimeScript</i> 5X	2 µL
Oligo(dT)	0.5 µL
Random 6 mers	0.5 µL
<i>PrimeScript RT mix</i>	0.5 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 10 µL

Taula 3.13. Condicions transcripció inversa del cDNA.

Condicions transcripció inversa del cDNA		
Pas	Temperatura	Temps
Retrotranscripció	37 °C	15 min
Innactivació MMLV-RT	85 °C	5 min

Un cop obtinguda la mostra retrotranscrita, es van afegir 10 µL d'aigua lliure de nucleases per tal de treballar amb mostres de 250 ng. El cDNA es va conservar a -20°C per a ser utilitzat per analitzar-lo per qPCR, veure l'*apartat 3.1.3.2*.

3.2.4. Anàlisi de l'expressió del microRNA

L'anàlisi de l'expressió del microRNA (miRNA) es va realitzar mitjançant qPCR basada en l'ús de sondes *TaqMan*. Aquesta tecnologia permet detectar fragments de seqüències curtes i augmentar l'especificitat de la quantificació.

La retrotranscripció de miRNA madurs es va dur a terme seguint un protocol lleugerament diferent a la de mRNA degut a la mida reduïda del fragment (20-25pb).

Es va requerir d'una estratègia amb l'ús d'uns encebadors específics que a banda de la seqüència d'homòloga al miRNA, contenen una estructura en forma de *loop* que allarga la seqüència del cDNA. Permetent la unió de la mostra de cDNA amb els encebadors de la qPCR i les sondes fluorescents de la tecnologia *TaqMan* (Taula 3.14).

La transcriptasa inversa i els encebadors específics per a cada miRNA madur es van obtenir de manera comercial de *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems – ref. 4366596) (Taula 3.15). Veure els encebadors utilitzats a l'*Annex Taula 8.1*.

Taula 3.14. Protocol reacció transcripció inversa del miRNA.

Reacció transcripció inversa del miRNA (5 µL)	
RNA	2,5 ng
Tampó transcriptasa inversa 10X	0.75 µL
dNTPs +dTTP 100mM	0.075 µL
Inhibidor RNAsa 20U/ µL	0.095 µL
<i>MultiScribe</i> transcriptasa inversa 50U/ µL	0.5 µL
<i>TaqMan MicroRNA Assay RT Primer</i> 5x	1.5 µL
Aigua lliure de nucleases	Fins a 5 µL

Taula 3.15. Condicions transcripció inversa del cDNA.

Condicions transcripció inversa del cDNA		
Pas	Temperatura	Temps
Retrotranscripció	16 °C	30 min
	42 °C	30 min
Innactivació	85 °C	5 min

A continuació, la quantificació de miRNA es va realitzar per qPCR amb sondes *TaqMan*. Aquesta es basa en la combinació d'una banda d'encebadors, i per l'altra d'una sonda formada per un fluoròfor unit covalentment a l'extrem 5' d'un oligonucleòtid, i un desactivador de fluorescència a l'extrem 3'. Quan la sonda reconeix i s'hibrida a la seqüència de cDNA, l'activitat exonucleasa de la polimerasa degrada la sonda i permet que el fluoròfor s'escindeixi emetent fluorescència. El

termociclador detecta el senyal fluorimètric resultant, i de la mateixa manera que en la qPCR, la quantificació es basa en la determinació del cicle de PCR en què el nivell de fluorescència supera un llindar determinat.

Les reaccions de qPCR (Taula 3.16) es van dur amb el reactiu *TaqMan Universal PCR MasterMix* (Thermo Fischer Scientific - ref. 4324018) i el termociclador *QuantStudio 7* (Applied Biosystems) utilitzant les següents condicions (Taula 3.17):

Taula 3.16. Protocol reacció qPCR.

Reacció qPCR (10 µL)	
cDNA	2 µL
<i>TaqMan MicroRNA Assay 20X</i>	0.5 µL
<i>TaqMan Universal PCR MasterMix 2X</i>	5 µL
Aigua lliure de nucleases	2.5 µL

Taula 3.17. Condicions reacció qPCR.

Condicions qPCR			
Pas	Cicles	Temperatura	Temps
Desnaturalització inicial	1	95 °C	10 min
Desnaturalització	40	95 °C	15 s
Hibridació		60 °C	60 s

3.3. Manipulació de proteïnes

3.3.1. Western Blot SDS-PAGE.

El Western Blot és una tècnica utilitzada per a la identificació de proteïnes a partir d'un lisat proteic. La tècnica consisteix en tres fases: una primera de separació de les proteïnes en funció del pes molecular, on es realitza l'electroforesi en condicions desnaturalitzants. Una segona fase de transferència de les proteïnes a una membrana, i una última fase d'immunodetecció, mitjançant l'ús d'un anticòs específic que reconeix la proteïna d'interès.

3.3.1.1. Aïllament de proteïnes

L'aïllament de proteïnes cel·lulars provinents de cultiu cel·lular i de disgregat de teixit, es va fer mitjançant un tampó de lisi ric en sodi dodecil sulfat (SDS) (Taula 3.18) i en presència d'inhibidors de proteases, *Complete Mini Protease Inhibitor* (Roche – ref. 11836153001). Un cop homogeneïtzades les mostres amb el tampó de lisi, aquestes es van incubar a 98°C durant 10 min. Tot seguit, les restes cel·lulars van ser eliminades per centrifugació (16.000 g durant 5 min) i les mostres es van conservar a -20°C.

Taula 3.18. Protocol preparació tampó de lisi.

Tampó de lisi	
Tris HCl pH 6.8	50 mM
SDS	2% (p/v)
Glicerol	10% (v/v)
<i>Complete Mini Protease Inhibitor</i>	1% (v/v)

3.3.1.2. Quantificació de proteïnes

La quantificació de proteïnes es va realitzar mitjançant un assaig colorimètric basat en la reducció del coure (de Cu^{2+} a Cu^{1+}) en medi alcalí mediat pels enllaços peptídics de les proteïnes. La detecció colorimètrica es dona quan l'àcid bicinconínic s'uneix a Cu^{1+} i es produeix un canvi de color en la mostra. La quantificació es va dur a terme amb el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific – ref. 23225) i la lectura de l'absorbància de les mostres es va realitzar a 562 nm a l'espectrofotòmetre

Synergy HT (BioTek). Finalment, el valor d'absorbància es va extrapolar a una recta patró de concentracions creixents d'albúmina sèrica bovina (de 0 a 64 µg/µL) per tal d'obtenir la concentració de proteïnes.

3.3.1.3. Electroforesi en condicions desnaturalitzants

L'electroforesi de les mostres de proteïnes es va realitzar en gels d'acrilamida (SDS-PAGE) en presència d'agents desnaturalitzants, com el SDS i el ditiotreitòl (DTT). En el cas del SDS, es tracta d'un detergent amb funció desnaturalitzant, que actua trencant els enllaços covalents de les proteïnes; per altra banda, també proporciona una càrrega negativa uniforme a totes les proteïnes. El DTT és un agent reductor que trenca els ponts disulfur, de manera que desplega les proteïnes per tal que la conformació no afecti a la separació.

Les proteïnes avancen a través dels gels d'acrilamida, que consten de dues parts. Un primer gel, que actua com a concentrador i té un percentatge més baix d'acrilamida (4%) (Taula 3.19). El segon és el gel separador (10%) (Taula 3.19), que actua a mode de tamís molecular alentint el moviment de molècules grans i afavorint la migració de molècules petites. D'aquesta manera s'aconsegueix la separació de les proteïnes d'acord amb la seva mida quan són sotmeses a un camp elèctric.

Taula 3.19. Protocol preparació gels electroforesi.

Gel concentrador (4%)		Gel separador (10%)	
Acrilamida 30%	650 µL	Acrilamida 30%	3 mL
Tris HCl 0,5M pH 6,8	1.25 mL	Tris HCl 0,5M pH 6,8	2.5 mL
SDS 10%	50 µL	SDS 10%	100 µL
Aigua	3 mL	Aigua	4 mL
APS 10%	50 µL	APS 10%	100 µL
TEMED	10 µL	TEMED	10 µL

Es va treballar amb quantitats de proteïna d'entre 40 µg i 120 µg, en funció de la mostra i proteïna d'interès. Les mostres es van preparar en presència de tampó de càrrega 6X (Taula 3.20) i es van desnaturalitzar a 95°C durant 10 min. L'electroforesi es va córrer en tampó d'electroforesi (Taula 3.20) durant 1,5-2 hores fixant el voltatge a 100V. Per tal de poder identificar les bandes també es va carregar el

marcador de pes molecular pre-tenyit *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas – ref. SM0671).

Taula 3.20. Protocol preparació tampons electroforesi.

Tampó de càrrega 6X		Tampó d'electroforesi (1 L)	
Tris base	300 mM	Tris base	3 g
SDS	12% (p/v)	SDS	1 g
DTT	600 mM	Glicina	14,4 g
Blau de bromofenol	0.6% (p/v)	Aigua	Fins a 1 L
Glicerol	60% (v/v)		

3.3.1.4. Transferència a membrana

Una vegada realitzada l'electroforesi, es van transferir les proteïnes a una membrana per poder realitzar la immunodetecció. L'electrotransferència a les membranes de PVDF *Immunobilon® Transfer Membranes* (Merck Millipore Ltd – ref. IPVH20200) es van realitzar en el tampó de transferència (Taula 3.21) fixant l'amperatge a 400 mA durant 1h i a 4°C.

Prèviament, les membranes de PVDF es van activar submergint-les 3 min en etanol 100% seguit d'un rentat amb aigua, i es van equilibrar en el tampó de transferència. Una vegada acabada la transferència, les membranes es van netejar amb tampó TBS-T (Taula 3.21).

Taula 3.21. Protocol preparació tampons de transferència.

Tampó transferència (1 L)		Tampó TBS-T	
Tris base	3 g	Tris HCl pH 7.5	10 mM
Glicina	48 g	NaCl	100 mM
Aigua	Fins a 1 L	Tween® 20	0.1% (v/v)

3.3.1.5. Immunodetecció i revelat

Per a la detecció de les diferents proteïnes d'interès de la membrana es van utilitzar anticossos contra epítops específics de cadascuna d'aquestes. Per tal d'evitar que succeeixin unions inespecífiques, prèviament es va dur a terme una incubació d'1h

a temperatura ambient en solució de bloqueig (TBS-T amb llet desnatada en pols al 10%). Seguidament, es va procedir a la incubació amb l'anticòs primari específic (a la dilució determinada en TBS-T amb llet al 5%) durant 1h en agitació a temperatura ambient (TA) o tota la nit a 4°C. Els anticossos utilitzats han estat els següents (Taula 3.22):

Taula 3.22. Recopilació d'anticossos utilitzats en la immunodetecció de proteïnes.

Anticòs	Casa comercial	Referència	Dilució	Incubació
Anti - AASS	Sigma-Aldrich	HPA020734	1:300	O/N a 4°C
Anti - GAPDH	Merck Millipore	ABS16	1:1000	1h TA
Anti - PCGF3	Bio-Techne	NBP2-93613	1:1000	O/N a 4°C
Anti - RASSF4	Antibodies	A89518	1:1000	O/N a 4°C

Després d'eliminar l'excés d'anticòs amb dos rentats en TBS-T durant 10 min en agitació, les membranes es van incubar amb el corresponent anticòs secundari (marcat amb peroxidasa de rave) en la seva dilució determinada, durant 1h en agitació a temperatura ambient. Tots els anticossos primaris utilitzats en aquest treball tenien com a espècie d'origen biològic el conill, així doncs l'anticòs secundari utilitzat va ser *Polyclonal goat anti-rabbit Immunoglobulin HRP-conjugated* (Dako – ref. P0448) a una dilució 1:2000.

Finalment, es va realitzar la immunodetecció revelant amb el kit *Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Science – ref. RPN2209) que conté peròxid d'hidrogen i luminol. En la reacció del revelat, la peroxidasa conjugada amb l'anticòs secundari promou l'oxidació del luminol al degradar el peròxid d'oxigen. Aquesta reacció produeix quimioluminescència que és detectada amb el lector *LAS-4000* (Fujifilm).

La intensitat de les bandes detectades de les proteïnes d'interès va quantificar-se per densitometria amb el programa informàtic *ImageJ* (NIH). En tots els casos els valors d'intensitat de la banda d'interès es van relativitzar al valor d'intensitat de la banda control obtinguda d'una proteïna ubiqua, la GAPDH, de la mostra corresponent.

3.3.2. Assaig luciferasa

L'assaig luciferasa és un assaig de luminescència que mesura l'activitat de la luciferasa renilla i firefly, partint d'un cultiu cel·lular transfectat amb un o dos vectors d'expressió que continguin aquestes dues proteïnes.

En aquest treball, aquesta estratègia va permetre mesurar de manera indirecta l'expressió *in vitro* d'una seqüència de DNA d'interès, utilitzant el kit comercial *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega – ref. E1910). La seqüència d'interès es va clonar a la regió 3'UTR del gen de *Luciferasa Renilla*, el constructe també contenia el gen *Luciferasa Firefly*; veure la generació del constructe a l'*apartat 3.1.4.5.2*. Així doncs, l'activitat de la luciferasa renilla era directament proporcional a l'expressió de la seqüència de DNA d'interès, es van normalitzar els valors per l'activitat de la luciferasa firefly.

Les cèl·lules es van transfectar de forma transitòria amb els plasmidis psiCHECK-2_AASS_Humà o psiCHECK-2_AASS_Ratolí i els plasmidis d'estudi, l'assaig es va dur a terme a les 48 h post-transfecció, veure l'*apartat 3.4.2*. El lisat cel·lular es va obtenir després d'afegir un tampó de lisis (PLB) sobre el cultiu cel·lular i incubar-les a -80°C durant 1h. En una placa blanca opaca de 96 pous es va afegir 10µL de cadascuna de les mostres. En primer lloc, es va afegir 50µL del reactiu comercial de luciferina (LARII) a cada mostra i es va mesurar la luminescència corresponent a l'activitat de la luciferasa firefly. Després, es va afegir 50µL del reactiu comercial de coelenteracina (Stop&Glo), per tal de mesurar l'activitat de la renilla luciferasa. Les lectures de luminescència de les mostres es van realitzar amb l'espectrofotòmetre *Synergy HT* (BioTek).

3.3.3. Assaig luminescència - Activitat enzimàtica de l'AASS

L'anàlisi de l'activitat enzimàtica de l'AASS es va dur a terme mitjançant una estratègia de mesura indirecta. Mitjançant una reacció de luminescència es va detectar la quantitat de NAD(P)H, cofactor de l'AASS.

L'assaig es va realitzar seguint el kit comercial *NAD(P)H-Glo™ Detection System* (Promega – ref. G9061). Partint d'un lisat provinent d'un cultiu cel·lular el qual contenia NAD(P)H de forma endògena. En presència de NAD(P)H del lisat i del

substrat comercial de reductasa amb proluciferina, l'enzim reductasa forma luciferina. Aleshores, la luciferina es va quantificar mitjançant la luciferasa recombinant Ultra-Glo™ (rLuciferasa), emetent un senyal de fluorescència el qual era proporcional a la quantitat de NAD(P)H a la mostra. Els valors de NAD(P)H eren inversament proporcionals a l'activitat d'AASS, ja que es mira el seu consum.

Les cèl·lules es van cultivar en absència i presència de lisina 10 mM durant 72 h per tal d'estimular el catabolisme d'aquest aminoàcid, i per tant l'activitat de l'AASS. El lisat cel·lular es va obtenir després d'afegir un tampó de lisis (PLB) sobre el cultiu cel·lular i incubar a -80°C durant 1h. En una placa blanca opaca de 96 pous es van afegir 50µL de cadascuna de les mostres per duplicat, i a continuació 50µL de la solució de detecció de luciferina comercial. Transcorreguda 1h d'incubació a temperatura ambient, es va realitzar la mesura de luminescència, utilitzant l'espectrofotòmetre *Synergy HT* (BioTek).

Finalment, es va realitzar la mesura de quantitat de proteïna per tal de poder normalitzar els valors, veure l'*apartat 3.3.1.2*.

3.4. Tècniques de cultius cel·lulars

3.4.1. Línies cel·lulars i condicions de cultiu.

Totes les línies utilitzades en aquest treball es van cultivar en cultius adherents a 37°C i 5% de CO₂. Les cèl·lules es van cultivar en *DMEM* (*Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Thermo Fisher Scientific - ref. 41966052) o bé *Advanced DMEM/F-12* (Life Technologies – ref. 12634-028) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (*Gibco Fetal Bovine Serum*; Thermo Fisher Scientific – ref. 10270106), 2mM de glutamina, 100 U/mL de penicil·lina i 100 mg/mL d'estreptomicina.

Les línies cel·lulars utilitzades han estat (Taula 3.23):

Taula 3.23. Recopilació de línies cel·lulars utilitzades.

Línia cel·lular	Tipus cel·lular	Origen	Medi
NIH 3T3	Línia cel·lular murina de fibroblasts embrionaris.	ATCC	DMEM
HEK293	Línia cel·lular humana derivada de teixit epitelial de ronyó embrionari.	ATCC	DMEM
SH-SY5Y	Línia cel·lular humana de neuroblastoma.	ATCC	DMEM:F12 (1:1)

3.4.2. Transfeccions

La introducció de DNA exogen per a la seva expressió transitòria o estable en cèl·lules eucariotes es va dur a terme a través de dos procediments diferents: transfecció mitjançant fosfat càlcic i transfecció mitjançant nanopartícules lipídiques.

En ambdues metodologies les cèl·lules es van sembrar 24h prèvies a la transfecció a una densitat cel·lular determinada, per tal de permetre la divisió cel·lular fins al final de l'experiment.

Amb l'objectiu d'induir l'expressió estable d'un vector d'interès exogen, es va co-transfectar un plasmidi d'interès i un plasmidi p_BABE_puro (Addgene - ref.1764) a una proporció 10:1. La introducció d'aquest plasmidi retroviral, donava lloc a

l'expressió del gen de resistència a la puromicina. A les 48h de la co-transfecció, les cèl·lules es van seleccionar amb puromicina (2,5µg/ml), i posteriorment es va realitzar l'aïllament i validació de clons. Aconseguint així, un cultiu on la totalitat de les cèl·lules incorporaven el plasmidi d'interès.

3.4.2.1. Transfecció mitjançant fosfat càlcic

La tècnica es basa en la generació de precipitats de fosfat càlcic- DNA a partir de la incubació del vector de DNA amb una solució de clorur de calci en un tampó de sals. Aquests precipitats s'afegeixen al cultiu cel·lular i són interioritzats per les cèl·lules mitjançant endocitosi.

Les transfeccions mitjançant fosfat càlcic es van fer seguint el protocol associat al kit *CalPhos™ Mammalian Transfection Kit* (Clontech® Laboratories - ref. 631312). Per formar els precipitats la solució salina comercial (HBS) es va afegir gota a gota a un tub que contenia prèviament el DNA d'interès i la solució de calci 2M. Transcorreguts 20 min, el precipitat es va afegir al cultiu cel·lular. Al cap de 24 h, el medi de cultiu es va canviar per un medi fresc. Finalment, al cap de 48 h post-transfecció es van iniciar els estudis d'expressió corresponents a cada experiment.

3.4.2.2. Transfecció mitjançant nanopartícules lipídiques

Aquesta estratègia es basa en la formació de nanopartícules lipídiques anomenades liposomes, que contenen el DNA d'interès al seu interior. Els liposomes carregats positivament a la seva superfície poden fusionar-se amb la membrana plasmàtica de les cèl·lules vives, permetent que el DNA arribi al citoplasma.

Les transfeccions mitjançant liposomes es van fer seguint el protocol associat al kit *Lipofectamine 3000* (Thermo Fisher Scientific - ref. L3000008). Per tal de formar els liposomes, el DNA d'interès es va dissoldre en les solucions comercials. Transcorreguts 15 min, el complex lípid- DNA es va afegir al cultiu cel·lular. Al cap de 48 h post-transfecció es van iniciar els estudis d'expressió corresponents a cada experiment.

3.5. Tècniques de manipulació animal

Tots els protocols i procediments de manipulació animal realitzats en aquest treball van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona i el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. En tot moment s'han seguit les directrius de la Unió Europea per la correcta cura i manipulació dels animals de laboratori 86/609/EEC i el decret 214/1997 del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

Els animals utilitzats en aquest estudi van ser ratolins d'entre 1 dia i 6 mesos de vida de dues soques diferents: la soca C57BL/6J adquirida a ENVIGO i la soca B6.129S4-Gcdhtm1Dmk/Mmnc (homozigot knock-out per a la Gcdh) obtinguda del Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC) de la Universitat de Carolina del Nord.

Els animals van ser estabulats a l'estabulari SPF (*Specific Pathogen Free*) de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. L'estabulació es va dur a terme en un ambient amb condicions controlades de: gàbies de plàstic (màxim 5 animals per gàbia), temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humitat (60%), cicle de llum- fosc de 12h amb aigua i menjar *ad libitum*. Els ratolins van ser alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard (SD, per les seves sigles en anglès) o una dieta alta en lisina (HLD, per les seves sigles en anglès) 4,7%. Els animals van començar la dieta HLD en el deslletament a les 3 setmanes de vida. La dieta alta en lisina (HLD) al 4.7% va ser preparada per la empresa ENVIGO (ref. MD.170563).

3.5.1. Administració *in vivo*

3.5.1.1. Intravenosa

L'administració sistèmica dels vectors virals AAV9 per via sanguínia es va realitzar en tres edats diferents del estadi del desenvolupament del ratolí: P1 en període neonatal, P15 període jove, P30 període adult-jove. Al llarg dels grups experimentals es van administrar dosis de: $7,5 \times 10^{12}$ vg/kg, $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg i 5×10^{13} vg/kg.

3.5.1.1.1. Intravenosa en edat neonatal

L'administració en edat neonatal (P1) es va realitzar a través de la vena temporal amb una agulla de 30 G. En el cas de P1 els vectors virals es van diluir en solució salina fins al volum final de 30 µL a temperatura ambient.

Prèviament a qualsevol manipulació, els ratolins es van anestesiar amb gel sec durant 30-60 s. A continuació, el ratolí a injectar es va col·locar sota un estereoscopi, per tal de reconèixer correctament la vena temporal i procedir a l'administració dels vectors virals. La vena temporal està just anterior al inici de l'orella en ratolins i és clarament visible a cada costat del cap durant els dos primers dies després del naixement utilitzant un microscopi de dissecció .

Un cop feta l'administració, es va esperar a la recuperació de la cria, que es va detectar per un canvi a la coloració de la pell i el restabliment del moviment i reflexos. Finalment, el ratolí es va retornar a la gàbia amb els progenitors, recobrint-lo amb el material del niu per tal de garantir la re-acceptació per part dels progenitors.

3.5.1.1.2. Intravenosa en edat jove o jove-adult (P15 i P30)

L'administració en edat jove o jove-adult (P15 o P30 respectivament) es va realitzar a través de la vena de la cua amb una agulla de 29 G. En aquest cas, els vectors virals es van diluir en solució salina fins al volum final d'administració de 100 µL a temperatura ambient.

Per dur a terme l'administració, es va immobilitzar l'animal en un *restrainer*. Per tal de vasodilatar la vena es va aplicar calor mitjançant llum infraroja i un massatge amb alcohol. La vasodilatació és essencial per tal d'obtenir una administració òptima dels vectors virals al torrent sanguini.

3.5.1.2. Cisterna Magna

L'administració locoregional dels vectors virals per via cisterna magna es va realitzar en dues edats diferents del estadi del desenvolupament del ratolí: P15 període jove i P30 període adult-jove. Les dosis administrades van ser de $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg i $7,5 \times 10^{12}$ vg/kg respectivament.

Es va administrar un volum de 10 µL utilitzant una xeringa *Hamilton* amb agulla de 34 G.

Prèviament a qualsevol manipulació, els ratolins es van anestesiàr mitjançant l'exposició a isofluorà 4%. A continuació, la part posterior del cap es va rapar i esterilitzar amb alcohol 96%. Es va col·locar el ratolí de manera que exposés al màxim la regió de la cisterna magna i es va fer una incisió des de la cresta occipital fins al clatell de l'animal d'aproximadament 1 cm. Es va localitzar el *foramen magnum* en la part més posterior de la línia mitjana i es va procedir a administrar els vectors virals realitzant una injecció lenta (aproximadament 10 µL en 10 segons). Finalment, es va tancar la incisió amb l'adhesiu tissular *Hystoacryl* (Braun – ref. 1050044). Es va retornar el ratolí a la gàbia i es va comprovar la correcta recuperació.

Aquesta tècnica es va aplicar segons el protocol establert i compartit pel Laboratori d'Enginyeria Genètica Animal i Teràpia Gènica del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (Haurigot et al., 2013).

3.5.2. Eutanàsia i obtenció de mostres

Per l'eutanàsia i presa de mostres, els animals es van anestesiàr amb anestèsia inhalatòria amb isofluorà, *IsoVet* (Braun – ref. 469860) i es van eutanasiar per dislocació cervical.

Prèviament a l'eutanàsia i sota els efectes de l'anestèsia, es va extreure sang realitzant una punció cardíaca amb una agulla de 29 G. Les mostres de sang es van centrifugar a 3500 rpm durant 15 min i el sèrum obtingut es va mantenir a -80°C fins al seu anàlisi.

Paral·lelament, es van extreure els següents òrgans: fetge, ronyó i cervell. Del cervell sencer se'n van destriar l'escorçar cerebral i el nucli estriat. Totes les mostres es van congelar immediatament en nitrogen líquid i conservar a -80°C fins al seu anàlisi, per tal de preservar totes les seves condicions natives.

3.6. Anàlisi bioquímiques

3.6.1. Homogenats de teixits

Per tal d'obtenir els compostos àcids dels teixits, es va partir d'un homogenat de les mostres de fetge i estriat. Pel que fa al sèrum, es va partir de la mostra processada en el moment de l'eutanàsia, veure l'*apartat 3.5.2*.

Es va treballar amb un fragment de teixit d'uns 20-50 mg, les mostres es van disgregar en 350 µL tampó mannitol (Taula 3.24) utilitzant un èmbol motoritzat a 800 rpm. Les restes cel·lulars van ser eliminades per centrifugació (650 g) durant 10 min a 4°C. El procés es va repetir una segona vegada i les mostres es van conservar a -80°C. Cal destacar que tot el procediment es va realitzar en fred.

Taula 3.24. Protocol preparació tampó Mannitol.

Tampó Mannitol (pH 7,2)	
Mannitol	225 mM
Sucrosa	75 mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,1mM

Amb l'objectiu de normalitzar els resultats finals, es va quantificar la concentració de proteïnes de les mostres, veure l'*apartat 3.3.1.2*.

3.6.2. Quantificació d'àcids dicarboxílics, metabòlits clau de l'AG1

La mesura dels nivells d'àcid glutàric (GA) i àcid 3-hidroxiglutàric (3-OH-GA) es va realitzar en sèrum, i homogenats de fetge i estriat, mitjançant ultra cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrometria de masses en tàndem (UPLC-MS/MS).

Per tal d'obtenir els compostos àcids dels teixits, es va partir d'un homogenat de les mostres de fetge i estriat preparats com s'especifica a l'*apartat 3.6.1*. Pel que fa al

sèrum, es va partir de la mostra processada en el moment de l'eutanàsia, veure l'apartat 3.5.2.

Per a l'anàlisi 100 µL de sèrum o de teixit es van barrejar amb una solució aquosa que contenia els estàndards interns dels àcids d'interès marcats amb deuteri (àcid glutàric-d4 i àcid 3- hidroxiglutàric-d5), necessaris per la quantificació dels metabòlits clau (Taula 3.25). Els compostos àcids es van aïllar passant aquesta barreja per una placa Oasis HLB de 96 pous amb una matriu d'absorció de 60 mg per a teixits (Waters – ref. 186000679) i 30 mg per a sèrum (Waters – ref. WAT058951). Aquestes plaques contenen un adsorbent polimèric universal de fase reversa que permet l'extracció de compostos a partir de diferents matrius. Amb aquest primer pas els compostos àcids quedaven retinguts a la membrana d'absorció, mentre que aquells components no desitjats eren eliminats. A continuació, es va afegir una solució d'acetonitril/metanol (90/10), que mitjançant el buit permetia l'elució dels compostos d'interès. Finalment, es va afegir el mateix volum d'àcid fòrmic al 0,4% a la mostra, per tal de facilitar la posterior ionització i la seva detecció mitjançant UPLC-MS/MS. Les mostres es van conservar a -20°C fins al seu anàlisi, presentant una estabilitat d'un màxim de dues setmanes.

En paral·lel a les mostres, es va preparar una corba de calibratge de nou punts en un rang de 0 a 250µM per a cadascun dels compostos i contenint la matriu biològica corresponent en cada cas. Es preparaven a cada sèrie analítica igual que les mostres partint de 100 µL de cada solució estàndard a diferent concentració.

Taula 3.25. Protocol preparació mostra per l'aïllament de compostos àcids.

Preparació mostra aïllament de compostos àcids	
Sèrum, homogenat teixit o punt corba	100 µL
Solució aquosa d'estàndards deuterats	25 µL
Aigua miliQ	250 µL

Un cop preparades les mostres es van analitzar amb un UPLC-MS/MS. La separació cromatogràfica es va realitzar en un sistema ACQUITY UPLC (Waters) amb una columna ACQUITY Premier BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm). El cabal del flux es va

establir a 320 µL/min mitjançant una barreja binària de dissolvent A (aigua amb 0,4% d'àcid fòrmic) i dissolvent B (metanol amb 0,4% d'àcid fòrmic).

Els àcids d'interès es van detectar mitjançant espectrometria de masses en tàndem XevoTQ-S (Waters), utilitzant una ionització negativa i un mètode de *multiple reaction monitoring* (MRM) per a la detecció dels ions característics de cadascun dels compostos. La transició que es va utilitzar va ser 131 > 87 per GA i 147 > 85 per 3-OHGA. Els temps de retenció van ser de 2,24 i 1,16 min, per GA i 3-OH-GA respectivament. Els valors es van quantificar amb el programari Targetlynx (Waters) utilitzant una corba de calibratge dels dos compostos. Finalment, els resultats es van normalitzar pel contingut de proteïnes i es van expressar en (µM en plasma o nmol/mg prot en teixits.).

3.6.3. Quantificació de la peroxidació lipídica

L'anàlisi de la peroxidació lipídica, indicador d'estrès oxidatiu en cèl·lules i teixits, es va dur a terme mitjançant la quantificació de malondialdehid (MDA). El MDA és un dels productes que es genera arran de la peroxidació d'àcids grassos poliinsaturats, que es dona en contextos de lesió oxidativa de les membranes cel·lulars.

La mesura de MDA es va realitzar seguint l'assaig colorimètric del kit comercial *BIOXYTECH LPO-586* (OxisResearch – ref. 21012). Partint d'un homogenat de mostres d'estriat en PBS (pH=7.4), el MDA endogen de la mostra reacciona amb els reactius comercials, donant a lloc a un cromòfor estable d'absorbància 586nm.

Els valors de l'absorbància es van extrapolar a una recta patró de concentracions conegudes (0 a 200 µM MDA). Finalment, els resultats es van normalitzar pel contingut de proteïnes present a la mostra.

3.6.4. Quantificació de paràmetres bioquímics en sèrum

La quantificació dels nivells de l'activitat de fosfatasa alcalina, proteïna total, colesterol i triglicèrids es va analitzar en els sèrums dels grups d'animals indicats. Es van realitzar seguint els procediments estàndards del fenotipatge de models murins en el German Mouse Clinic del Helmholtz Zentrum München (Fuchs et al. 2018).

3.7. Anàlisi histològiques

3.7.1. Obtenció i processament de mostra

Per a les tècniques d'histologia, prèviament a l'eutanàsia dels ratolins es va realitzar un procés de perfusió transcardíaca amb una solució salina seguida de de paraformaldehid al 4% (PFA). Aquesta tècnica permet netejar la sang i preservar millor les estructures tissulars i cel·lulars del cervell.

Al llarg del procediment els ratolins estaven sota els efectes de l'anestèsia inhalatòria. Per tal de crear un circuit transcardíac obert, es va penetrar el ventricle esquerre amb una palometa d'infusió, i es va realitzar un tall a l'aurícula dreta. La solució salina i el PFA es van administrar amb una xeringa de 20 mL realitzant una infusió lenta (aproximadament 1 mL en 5 s). Un cop perfós el ratolí, es van recol·lectar els teixits d'interès (fetge, ronyó i cervell) i es van mantenir en PFA al 4% durant 24h a 4°C per després ser incloses en blocs de parafina.

Pel que fa els cervells, es van realitzar talls coronals en seccions de 6 µm a dues profunditats diferents en les que quedés exposat l'estriat. Pel que fa el fetge i ronyó, es van fer talls de 5 µm.

La inclusió en blocs de parafina i els talls es va realitzar a la plataforma del Servei de Biobanc de la Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica- IDIBAPS.

3.7.2. Tincions histològiques

3.7.2.1. Tinció hematoxilina/eosina de les seccions tissulars

La tinció d'hematoxilina/eosina és una metodologia de tinció més popular per analitzar histologies tissulars. L'hematoxilina marca amb un colorant morat els components nuclears, inclosos l'heterocromatina i els nuclis cel·lulars, degut a l'afinitat a estructures àcides. Mentre que l'eosina tenyeix amb un color rosat els components citoplasmàtics, com ara el col·lagen i les fibres elàstiques, les fibres musculars i els glòbuls vermells.

Per realitzar la tinció, les mostres es van desparafinar, i es van tenyir primerament amb hematoxilina. Després d'un rentat amb aigua destil·lada, es van tenyir amb

eosina. Posteriorment es van deshidratar les mostres, i muntar en un portaobjectes per poder analitzar.

Les tincions d'hematoxilina/eosina van ser realitzades per la plataforma del Servei del Biobanc de la Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica– IDIBAPS.

3.7.2.2. Immunohistoquímica de les seccions de cervell de parafina

La immunohistoquímica permet la detecció de components concrets del teixit que es vol estudiar. Aquestes tincions es realitzen mitjançant l'ús d'anticossos d'unió a proteïnes específiques, que posteriorment es conjuguen amb anticossos secundaris que permeten el marcatge amb peroxidasa i la seva detecció. La intensitat de la tinció permet realitzar una anàlisi semiquantitativa de l'expressió i localització de la proteïna d'interès.

Per realitzar les immunohistoquímiques es va utilitzar un protocol de desparafinació i rehidratació de les seccions. Els talls histològics es van submergir durant 10 min en solució de xilol (3 repeticions), etanol 100% (2 repeticions), etanol 96%, etanol 70% i etanol 50%, fins acabar amb una immersió en aigua destil·lada.

Amb l'objectiu de facilitar el reconeixement de l'epítot per part de l'anticòs primari, les seccions es van sotmetre a un tractament de recuperació antigènica. Les mostres es van bullir a una olla a pressió amb una solució de tampó citrat durant 5 min.

Cal destacar que, per a la immunohistoquímica de 8-oxodG no es va realitzar al tractament de recuperació antigènica, ja que l'anticòs detectava un nucleòtid guanosidat del DNA, i no un antigen. Per evitar detectar 8-oxodG del RNA, es va realitzar un tractament de les mostres amb RNAsaA 5mg/mL 1h (Qiagen – ref. 19101) i posteriorment HCl 2N 5 min, seguit de Tris pH 8,8 5 min per evitar la desnaturalització de la mostra. Es va prosseguir amb el bloqueig i l'anticòs primari.

Per tal d'evitar el marcatge inespecífic, les mostres es van incubar amb una solució de bloqueig rica en albúmina durant 1,5 h en una cambra humida. Un cop finalitzat el bloqueig, es van realitzar rentats de 5 min en PBS (3 repeticions).

En aquest moment es van incubar les mostres amb els anticossos primaris específics O/N a 4°C a la dilució corresponent amb PBS i 0,1% BSA. Els anticossos utilitzats han estat els següents (Taula 3.26):

Taula 3.26. Recopilació d'anticossos utilitzats per a la immunohistoquímica.

Anticòs	Casa comercial	Referència	Dilució
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Sigma-Aldrich	G3893	1:800
Anti-Myelin Basic Protein (MBP)	BioLegend	836504	1:1200
Anti-NeuN, clon A60(NeuN)	Sigma-Aldrich	MAB377	1:1200
Anti 8-oxodG, clon N45.1(8-oxodG)	Abcam	ab48508	1:100

A l'endemà, es rentaven amb PBS (3 repeticions) i es realitzava un bloqueig de les peroxidases endògenes per tal d'evitar un marcatge inespecífic. El bloqueig es va realitzar incubant les seccions amb una solució de bloqueig comercial *Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent* (Agilent – ref. S200380-2) durant 10 min a temperatura ambient. Després de tres rentats amb PBS, les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari *Dako EnVision® + Dual Link System-HRP (DAB+)* (Agilent – S200380-2), durant 1h a temperatura ambient. Un cop finalitzada la incubació es van realitzar rentats de 5 min en PBS (3 repeticions).

El revelat es va dur a terme amb el reactiu comercial del kit, el qual utilitza 3,3-diaminobenzidina (DAB) com a cromogen. A continuació, les mostres es van tenyir amb solució d'Hematoxilina de Harris (PanReac AppliChem – ref. 253949.1610). Posteriorment, es van deshidratar les mostres realitzant el protocol invers al descrit anteriorment. Finalment, es van muntar sobre un portaobjectes amb el medi de muntatge *DPX mountant for histology* (Sigma-Aldrich – ref. O6522).

Per realitzar l'anàlisi, totes les tincions es van escanejar amb un objectiu de 20X. Aquest servei el va realitzar la plataforma del Servei del Biobanc de la Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica– IDIBAPS.

L'anàlisi i la quantificació dels talls histològics es va dur a terme mitjançant el programa QuPath-0.5.0. Per quantificar els marcatges, es va seleccionar la regió d'interès, es van ajustar els paràmetres òptims al programa i es va procedir a la

detecció per contrast. Els valors es van representar en % d'àrea de vacuoles, % de cèl·lules positives per GFAP i 8-oxodG, % d'àrea tenyida per MBP i nombre de cèl·lules per mm² per NeuN.

3.8. Recursos bioinformàtics

3.8.1. Recursos informàtics relacionats amb els dissenys de miRNA

Ensembl – plataforma bioinformàtica que recopila els genomes eucariotes seqüenciats així com els transcrits. En el cas d'aquest treball s'hi va fer la cerca de les seqüències, transcrits i dominis estructuralment conservats de l'AASS en el genoma humà i de ratolí.

Nucleotide BLAST – plataforma bioinformàtica per l'alineament de seqüències de DNA. L'algoritme compara la seqüència problema amb les seqüències d'una base de dades per tal d'identificar les que tenen més homologia. En aquest treball es va utilitzar per identificar l'homologia de les seqüències candidates miR_AASS amb el cDNA de l'AASS d'humà i ratolí. A més, també va ser útil per tal d'identificar els possibles *off-targets*.

ViennaRNA *forna* – eina de visualització d'estructura secundària de RNA. La plataforma es va utilitzar durant el disseny i visualització de les seqüències miR_AASS.

3.8.2. Altres recursos bioinformàtics

Primer3 – plataforma bioinformàtica que et permet dissenyar encebadors a partir d'una seqüència DNA patró.

3.9. Anàlisis estadístiques i representació gràfica

Les anàlisis estadístiques i representació gràfica de les dades obtingudes es van realitzar amb el programa Prism 8 (*GraphPad Software*). Els resultats es van expressar com a la mitja $\pm$ SEM (error estàndard mig).

Al llarg d'aquest treball totes les comparacions estadístiques es van avaluar mitjançant l'anàlisi de Mann-Whitney, un test no paramètric que tracta les mostres com a independents. A excepció de l'estudi de supervivència, en el qual es va utilitzar el mètode Kaplan-Meier i es va avaluar amb una prova de rang llarg (Mantel-Cox).

Les diferències es van considerar estadísticament significatives (*) quan el valor $p \leq 0,05$ i altament estadísticament significatiu (**) quan el valor $p \leq 0,01$, (***) quan el valor $p \leq 0,001$.

4.RESULTATS

4.1. Disseny i identificació dels miRNA amb capacitat de silenciar l'AASS *in vitro*

Per tal d'inhibir el primer pas de la via del catabolisme de la lisina com a aproximació terapèutica per a l'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1), es va proposar silenciar el gen AASS que codifica per a la proteïna alfa-aminoadípica semialdehid sintasa (AASS).

L'estratègia de silenciament escollida va ser l'ús de microRNA artificials (miRNA, per les seves sigles en anglès), aquests són molècules petites de RNA que participen en la regulació de l'expressió gènica, mitjançant la complementarietat específica a regions del RNA missatger (mRNA, per les seves sigles en anglès) diana. Aquesta estratègia basada en el mecanisme d'interferència del RNA (iRNA, per les seves sigles en anglès) s'ha posicionat com una proposta terapèutica atractiva d'inhibició post-transcripcional (Traber & Yu 2023).

Per assolir aquest objectiu s'han dissenyat diferents miRNAs, amb l'objectiu d'identificar aquell que indueix el silenciament del transcrit de l'AASS més eficientment.

4.1.1. Disseny dels miRNA

Els principals reptes que s'han d'afrontar en el disseny dels miRNA són els de maximitzar l'eficiència de silenciament i reduir-ne els possibles efectes no desitjats en altres gens (*off-target*). Així, per tal d'optimitzar els miRNA d'aquest treball, el disseny es va fer seguint diferents premisses descrites prèviament en la bibliografia (Bofill-De Ros & Gu 2016; Cabrera & Mueller 2016).

Per una banda, es van seleccionar les seqüències diana de reconeixement. Primerament, es va tenir en compte que les regions d'unió entre la seqüència diana i el miRNA estiguessin en zones de dominis estructuralment conservats de l'AASS. A més, es va prioritzar que la regió diana fos 100% homòloga entre el cDNA de l'AASS humà i l'Aass de ratolí. Això va ser així, ja que la estratègia terapèutica proposada s'avaluaria en un model de ratolí en el context d'aquesta tesi, però posteriorment es preten escalar a una fase clínica. En segon lloc, es van seleccionar seqüències diana de 19 a 22 nucleòtids, amb un contingut de nucleòtids GC del 40-60%, per tal d'afavorir la seva estructura i augmentar l'eficiència de silenciament. Finalment, per evitar possibles efectes *off-target* i comprovar que les seqüències diana eren

úniques en regions codificants d'humans i ratolins, es va fer una anàlisi d'homologia mitjançant l'eina bioinformàtica d'alineament de seqüències *Nucleotide BLAST* i es van excloure totes aquelles seqüències diana amb una homologia superior al 70% respecte a altres seqüències de cDNA del genoma humà o de ratolí.

D'altra banda, es van generar els dissenys de les seqüències de pri-miRNA d'estudi, que són les seqüències precursoras primàries a partir de les quals es processa el miRNA madur mitjançant el mecanisme endogen d'iRNA. Les pri-miRNA tenen una estructura de forqueta, estan formades per un *loop* flanquejat per dues seqüències de cadena senzilla complementàries entre si. La seqüència que conté l'extrem 5' s'anomena cadena guia, aquesta seqüència de 19-22 nucleòtids es va dissenyar per ser perfectament complementària a la seqüència diana. Mentre que la seqüència amb l'extrem 3', denominada cadena passatgera, es va dissenyar 100% homòloga a la seqüència diana (Figura 4.1A).

Per tal d'optimitzar l'eficiència del mecanisme d'iRNA es van introduir certes modificacions a les seqüències pri-miRNA. A la cadena guia, el nucleòtid de l'extrem 5' es va substituir per un nucleòtid A o T, per així millorar l'estabilitat termodinàmica del miRNA i afavorir l'activitat enzimàtica de l'Argonaute 2 (Ago2) (Cabrera & Mueller, 2016). A la cadena passatgera, a l'extrem 3' es va introduir un nucleòtid d'A extra, i el tercer nucleòtid de la seqüència es va intercanviar per un nucleòtid C o G. Aquestes canvis van generar una asimetria a l'estructura de forqueta, aportant una millor predisposició a la selecció adequada de la cadena guia i afavorint l'eficàcia de la cadena guia, reduint possibles efectes *off-target* no desitjats (Frank et al. 2010).

Pel disseny del *loop* es va utilitzar com a referència la seqüència de 18 nucleòtids del *loop* del pri-miR-16 humà endogen. A més, per tal d'aportar un major context genòmic i així millorar el processament del miRNA, es van afegir 100pb del pri-miR-16 humà endogen flanquejant les cadenes guia i passatgera (Watanabe et al., 2016). Veure la seqüències completes incloses en pri-miR-16 a l'Annex Taula 8.2.

Tenint en compte totes aquestes consideracions, es van dissenyar quatre seqüències pri-miR_AASS, que es van clonar a un plasmidi d'expressió que es va anomenar pmiR_AASS i que incloïa el promotor quimèric CAG i una senyal de poliadenilació

(Figura 4.1B). El promotor CAG contenia la seqüència *enhancer* del citomegalovirus (CMV), part del promotor de la β -actina de pollastre i l'intró de la β -globina de conill, fet que proporciona una expressió potent i ubiqua (Xu et al. 2001).

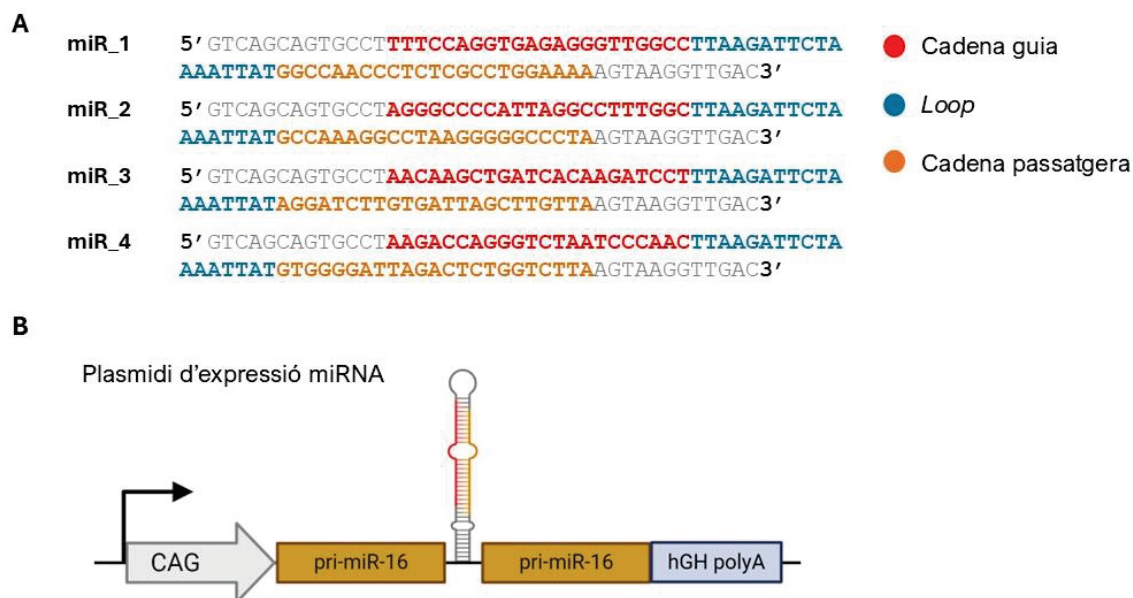


Figura 4.1. Representació esquemàtica del disseny de seqüències pri-miR_AASS. A) Disseny de les seqüències dels pri-miR_AASS candidates. B) Representació gràfica del plasmidi d'expressió pmiRNA_AASS.

4.1.2. Validació de l'eficiència de miR_AASS *in vitro*

Amb l'objectiu d'identificar aquelles seqüències pri-miR_AASS que tenien una millor eficiència de silenciament de l'AASS, es va realitzar un primer estudi *in vitro* mitjançant un assaig de luciferasa després de transfectar cèl·lules HEK293T amb els diferents plasmidis pmiR_AASS dissenyats, anomenats com: pmiR_1, pmiR_2, pmiR_3 i pmiR_4.

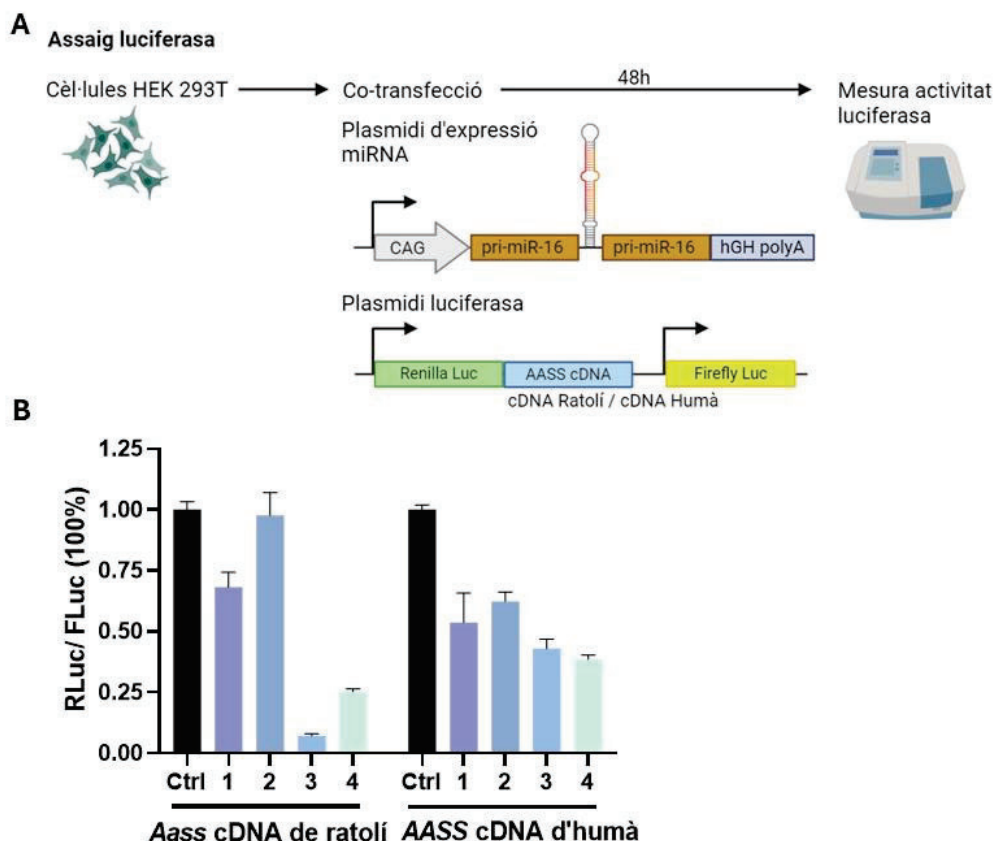


Figura 4.2. Estudi *in vitro* de l'eficàcia de silenciament del cDNA d'AASS. A) Representació esquemàtica de l'assaig de luciferasa. Les cèl·lules HEK293T es co-transfecten amb el plasmidi de luciferasa que conté el cDNA de l'AASS d'humà i l'Aass de ratolí (psiCHECK-2_AASS), i un plasmidi d'expressió buit (Control - Ctrl), o els plasmidis pmiRNA_AASS que contenen les diferents seqüències pri-miR_AASS anomenades: pmiR_1 (1), pmiR_2 (2), pmiR_3 (3), pmiR_4 (4). B) Quantificació de l'activitat RLuc/FLuc de l'assaig luciferasa. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n = 3 experiments independents.

Concretament, les cèl·lules HEK293T es van co-transfectar amb el plasmidi pmiR_AASS corresponent i un plasmidi psiCHECK-2_AASS que contenia les seqüències de cDNA d'AASS de ratolí o humà clonades a la regió 3'UTR del gen de la luciferasa *RLuc*. El mateix plasmidi contenia el gen de la luciferasa *FLuc* expressat sota un segon promotor, l'expressió d'aquest va permetre normalitzar per l'eficiència de transfecció. Mitjançant l'assaig de luminescència, es va analitzar l'activitat de la luciferasa (Figura 4.2A). La co-transfecció amb els plasmidis miR_AASS, pmiR_3 i pmiR_4, va donar lloc a una baixa activitat luciferasa en ambdues línies cel·lulars, indicant una bona eficiència de silenciament del cDNA d'AASS de ratolí i humà (Figura 4.2B).

Per tal d'identificar el miR_AASS més eficient, es van generar línies cel·lulars estables murines (NIH 3T3) i humanes (SH-SY5Y) que expressaven miR_3 i miR_4.

Amb l'objectiu d'aconseguir un cultiu homogeni que expressés els pmiR_AASS, i tenint en compte que aquests plasmidis no contenien cap gen de resistència a antibiòtics, es va realitzar un procés de co-transfecció amb un plasmidi de resistència a antibiòtic, i una posterior selecció i validació clonal (Figura 4.3A).

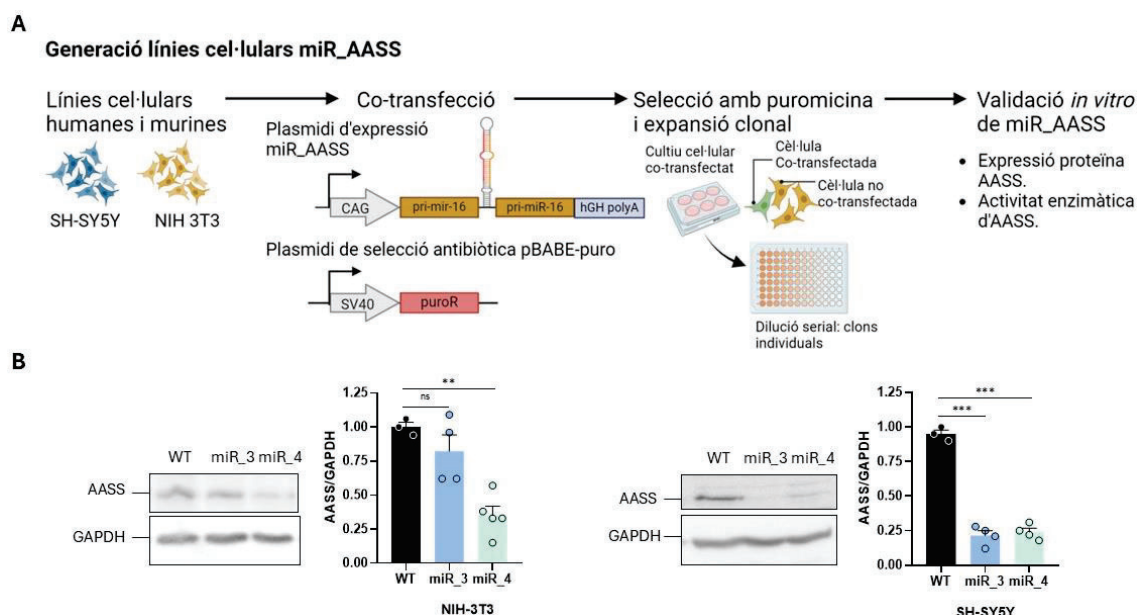


Figura 4.3. miR_4 indueix el silenciament d'Aass en línies cel·lulars de ratolí (NIH-3T3) i humanes (SH-SY5Y). A) Representació esquemàtica de la generació de línies cel·lulars que expressen els miR_AASS (miR_3 i miR_4). B) Anàlisi de *western blot* de línies *wild-type* (WT), i transfectades amb plasmidi pmiR_3 i pmiR_4 en cèl·lules NIH-3T3 (murines) i SH-SY5Y (humanes). Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM, n = 3-5 clons independents. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Un cop seleccionats tres clons per línia i tipus cel·lular, es va avaluar l'efecte sobre l'expressió proteica de l'AASS en ambdues línies cel·lulars. La major reducció de l'expressió de l'AASS tant en cèl·lules humanes com en les de ratolí es va observar amb miR_4 (Figura 4.3B).

Finalment, es va estudiar l'efecte de miR_4 sobre l'activitat enzimàtica de l'AASS, mitjançant la quantificació del consum de NADPH. L'AASS és el primer enzim de la via del catabolisme de la lisina, el domini lisina-cetoglutarat reductasa (LKR) converteix la lisina i l'α-cetoglutarat en sacaropina, de forma NADPH-dependent (Hutzler & Dancis, 1968; Leandro & Houten, 2020). Així doncs, la mesura de l'oxidació de NADPH, es pot considerar un assaig per mesurar l'activitat del domini LKR de l'AASS (Figura 4.4A).

4. Resultats

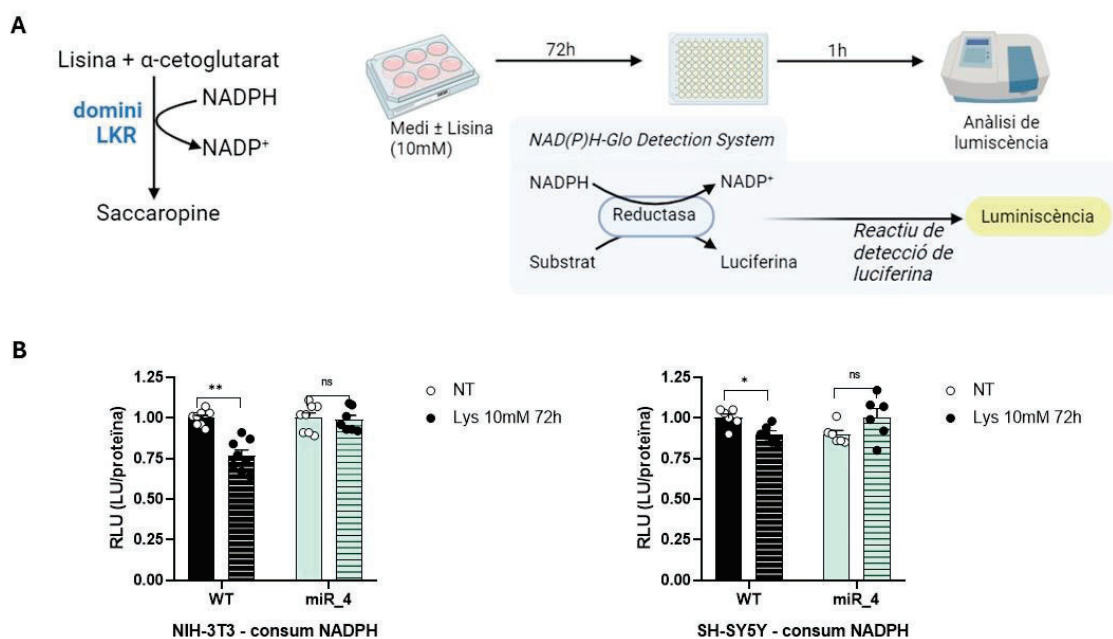


Figura 4.4. miR_4 redueix l'activitat d'AASS en línies cel·lulars de ratolí (NIH-3T3) i humanes (SH-SY5Y). A) Representació gràfica de la l'activitat del domini lisina-cetoglutarat reductasa (LKR), i de la mesura indirecta de l'activitat enzimàtica de l'alfa-aminoadipic semialdehid sintasa (AASS), mitjançant un kit de luminiscència que determina la quantitat de NADPH a l'extracte cel·lular. B) Quantificació de NADPH en extracte cel·lular mitjançant luminiscència. Línies *wild-type* (WT) i transfectades amb el plasmidi pmiR_4 en cèl·lules NIH-3T3 i SH-SY5Y exposades a un medi amb presència de lisina (10mM, 72h) o absència (no tractades, NT). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n = 6 experiments independents. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

Les línies cel·lulars *wild-type* (WT) i miR_4 es van cultivar en absència i presència de 10 mM de lisina durant 72h, per tal d'estimular l'activitat de l'AASS. En context de presència de lisina, en el que la via metabòlica d'aquest aminoàcid estava forçada, en línies WT la quantitat de NADPH disminuïa indicant un correcte funcionament de l'activitat enzimàtica de AASS. Per contra, en línies miR_4 la quantitat de NADPH es va mantenir respecte la condició d'absència de lisina. Aquest fet va suggerir que miR_4 induïa la inhibició de l'activitat enzimàtica de l'AASS (Figura 4.4B).

4.1.3. Estudi de l'especificitat de miR_AASS *in vitro*

Previ a prosseguir amb estudis *in vivo*, es va comprovar si l'impacte de miR_4 en la inhibició d'AASS era específic del disseny de les seqüències de la cadena guia i passatgera. Per tal d'estudiar l'especificitat de les seqüències, es va generar un miR_4-Scrambled (miR_4-Sc). Aquest, es tractava d'un pri-miR_AASS on la seqüència de la cadena guia i passatgera contenien els mateixos nucleòtids que pri-miR_4, però de forma desordenada. Per realitzar el disseny de miR_4-Sc es van seguir les

premisses descrites a l'apartat 4.1.1., i es va tenir en compte excloure seqüències diana que poguessin generar possibles efectes *off-target* no desitjats (Figura 4.5A).

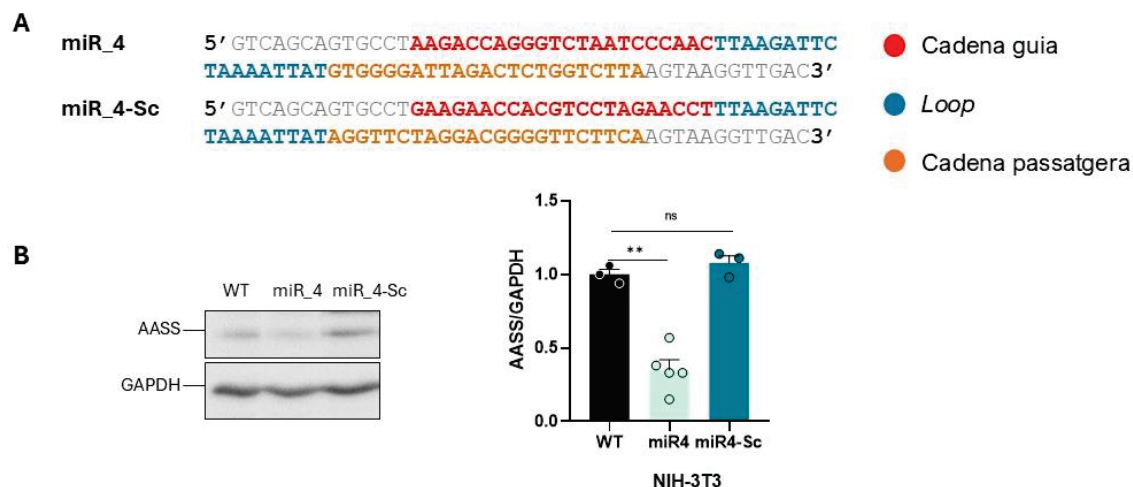


Figura 4.5. miR_4-Scrambled (miR_4-Sc) no té cap impacte sobre la inhibició de l'AASS. A) Disseny de les seqüències dels pri_miR_AASS: miR_4 i miR_4-Sc. B) Anàlisi de *western blot* de línies *wild-type* (WT), i transfectades amb els plasmidis pmiR4 i pmiR_4-Sc en cèl·lules NIH-3T3 (murines). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n = 3-4 clons independents. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

Es va generar una línia amb el plasmidi pmiR_4-Sc estable en cèl·lules de ratolí (NIH-3T3), seguint el mateix procediment que amb miR_4. Mitjançant l'anàlisi de l'expressió de proteïna de l'AASS, es va observar que miR_4-Sc no modulava l'expressió d'AASS (Figura 4.5B). Aquests resultats demostraven que miR_4-Sc no tenia cap efecte inhibidor sobre l'AASS, i que per tant, la inhibició de l'AASS per miR_4 era mediat per l'especificitat de la seqüència.

Aquests resultats *in vitro* van permetre seleccionar la seqüència miR_4 per la seva alta eficiència i especificitat de silenciament de l'AASS, d'aquí en endavant la seqüència miR_4 es va anomenar miR_AASS.

4.2. Avaluació de la biodistribució del vector AAV_miR_AASS i l'eficiència del silenciament de l'AASS en ratolins *Gcdh*^{-/-}

En l'abordatge de la validació *in vivo*, el vector seleccionat per a l'administració del constructe terapèutic miR_AASS, va ser un virus adenoassociat (AAV). Considerant que el teixit amb més afectació a l'AG1 és el sistema nerviós central (SNC), es va explorar l'ús de l'AAV de serotip 9, ja que aquest presenta tropisme cap al cervell i capacitat per creuar la barrera hematoencefàlica (BHE) (Dufour & McBride, 2016). Per altra banda, també es va treballar amb un AAV de serotip 9 modificat (AAV9_p31), el qual s'ha descrit que en ratolins augmenta l'eficàcia de lliurament genètic al sistema nerviós central respecte al AAV9 (Zhang et al., 2024). Així, es van generar dos vectors terapèutics AAV_miR_AASS amb la seqüència miR_4: AAV9_miR_AASS i AAV9_p31_miR_AASS; i un vector control amb la seqüència miR_Sc: AAV9_miR_Sc (Figura 4.6).

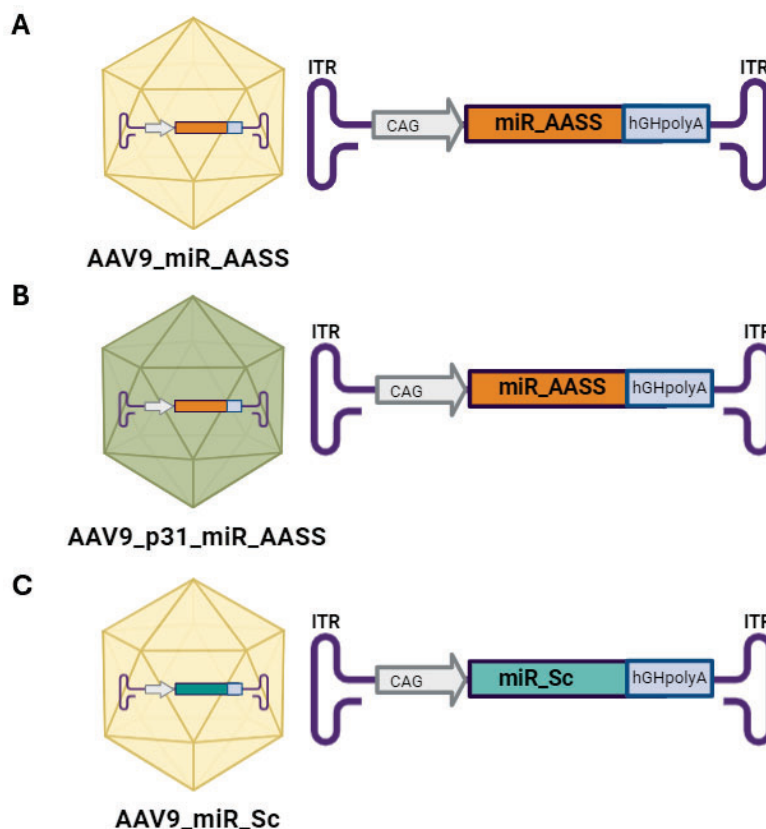


Figura 4.6. Representació esquemàtica dels vectors virals. A) Vector terapèutic AAV9_miR_AASS, AAV9 que conté la seqüència de miR_AASS miR_4 B) Vector terapèutic AAV9_p31_miR_AASS: AAV9_p31 que conté la seqüència de miR_AASS miR_4. C) Vector control AAV9_miR_Sc: AAV9 que conté la seqüència de miR_AASS miR_4-Sc.

Disposar d'un model animal d'AG1 prèviament caracteritzat, va ser essencial per poder estudiar aquesta nova aproximació terapèutica. Es va treballar amb el model de ratolí *knockout* (KO) pel gen *Gcdh* (*Gcdh*^{-/-} - B6.129S4-*Gcdh*^{tm1Dmk}/Mmnc) (Koeller et al., 2002). El model té un fenotip bioquímic similar al dels pacients d'AG1, mostrant nivells elevats d'àcid glutàric (GA, per les seves sigles en anglès) i àcid 3-hidroxiglutaric (3-OHGA, per les seves sigles en anglès), però no desenvolupa alteracions funcionals greus. S'ha descrit que per tal d'induir un fenotip neurològic que mimetitzi al del pacient, és necessari forçar la via metabòlica mitjançant l'alimentació amb dieta rica en lisina just després del període de deslletament (Zinnanti et al. 2006).

Per tal d'estudiar i optimitzar la biodistribució i eficiència de silenciament dels diferents AAV_miR_AASS *in vivo*, es van dissenyar set grups experimentals amb estratègies i temps d'administració diferents (Figura 4.7).

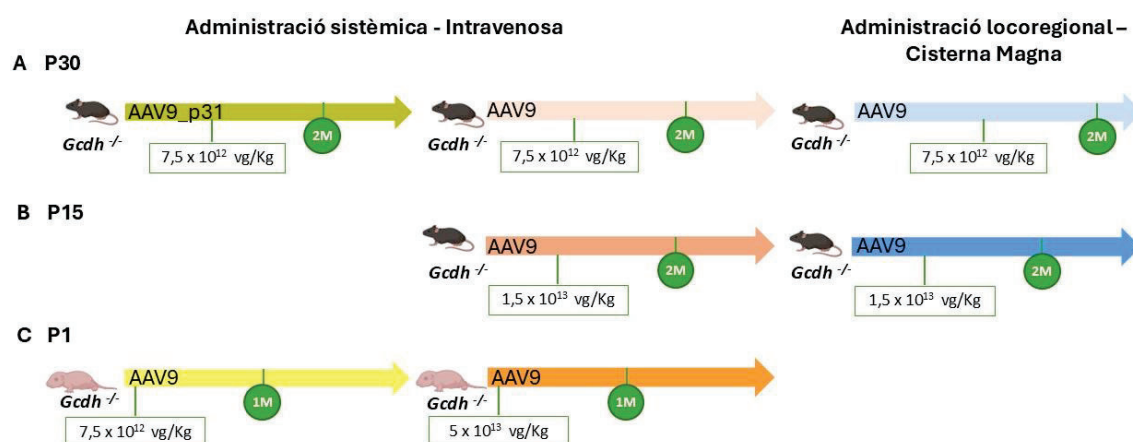


Figura 4.7. Representació esquemàtica dels grups experimentals *in vivo*. A) Administració a dia 30 post-natal (P30), dosi 7,5 x 10¹² vg/kg per via intravenosa: AAV9_p31_miR_AASS (AAV9_p31) i AAV9_miR_AASS (AAV9) o per via cisterna magna de l'AAV9. B) Administració a dia 15 post-natal (P15), dosi 1,5 x 10¹³ vg/kg: intravenosa i cisterna magna del AAV9. C) Administració intravenosa a dia 1 post-natal (P1) del AAV9 a dosi baixa (7,5 x 10¹² vg/kg) i dosi alta (5 x 10¹³ vg/kg).

Per realitzar aquests estudis preliminars *in vivo*, es va treballar amb mascles i femelles, i els animals es van eutanasiar èticament un mes post-tractament per recol·lectar-ne el sèrum i els teixits d'interès: fetge i estriat. Per una banda, el sèrum i el fetge es van utilitzar per estudiar l'efecte del diferents AAV_miR_AASS en teixits perifèrics. Cal destacar, que recentment s'ha descrit que en AG1 el restabliment de la funció metabòlica en fetge pot contribuir positivament en reduir la simptomatologia de la patologia (Barzi et al., 2023). Per altra banda, el nucli estriat

es va estudiar per analitzar l'efecte dels AAV_miR_AASS a cervell, ja que és la regió amb més afectació en els pacients amb AG1. De fet, en cervell, GA i el 3-OHGA s'acumulen localment sense poder creuar la BHE, i es conserven com a espècies reactives d'acil-CoA causant toxicitat neuronal (Kölker et al. 2006; Sauer et al. 2006).

4.2.1. Estudi de l'administració dels diferents AAV_miR_AASS a edat jove-adulta a dia 30 post-natal (P30)

D'entrada, es va explorar el potencial terapèutic de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) i AAV9_p31_miR_AASS (AAV9_p31) després d'una administració a dia 30 post-natal (P30), equivalent a una edat jove-adulta del ratolí. Es va administrar una dosi de $7,5 \times 10^{12}$ vg/kg, i es van estudiar dues vies d'administració diferents: la intravenosa (IV) per la vena de la cua per administrar l'AAV9 i l'AAV9_p31, i la via locoregional per injecció a cisterna magna (CM) per administrar només l'AAV9.

En primer lloc, es va estudiar la biodistribució del vector terapèutic mitjançant la mesura de la quantitat de molècules de miR_AASS madur generades als diferents teixits després de l'administració dels diferents AAV_miR_AASS. La quantificació es va dur a terme per qPCR mitjançant sondes TaqMan desenvolupades específicament per detectar el transcrit miR_AASS. Com a miRNA control es va analitzar l'expressió de miR-U6.

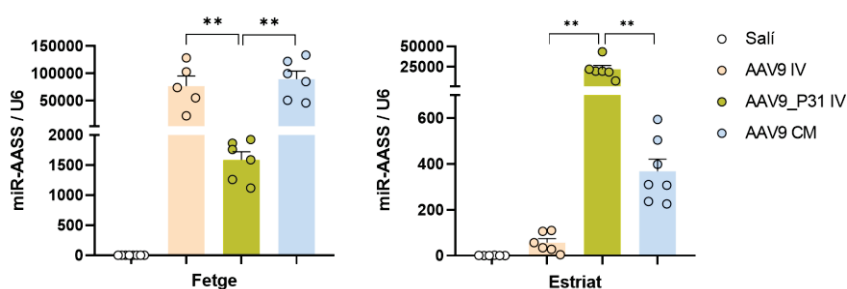


Figura 4.8. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells de miR_AASS madur després de l'administració dels vectors l'AAV9_miR_AASS (AAV9) i AAV9_p31_miR_AASS (AAV9_p31) a dia 30 post-natal (P30). Quantificació de molècules de miR_AASS madur en homogenats de fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, AAV9 per via intravenosa (IV), AAV9_p31 per via IV i AAV9 per via cisterna magna (CM). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-8 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Pel que fa al fetge, es van detectar alts nivells de miR_AASS madur en administrar l'AAV9 tant per via IV com per via CM. Respecte a l'administració de l'AAV9_p31, tot i mostrar bona expressió del miR_AASS madur, la transducció d'aquest vector a fetge

va ser significativament inferior al serotip AAV9. Per contra, en estriat va ser després de l'administració IV de l'AAV9_p31 que es van detectar còpies abundants del miR_AASS madur (Figura 4.8).

A continuació, es va analitzar l'efecte de l'administració dels diferents AAV_miR_AASS sobre els nivells d'expressió de proteïna AASS en fetge i estriat mitjançant *western blot*.

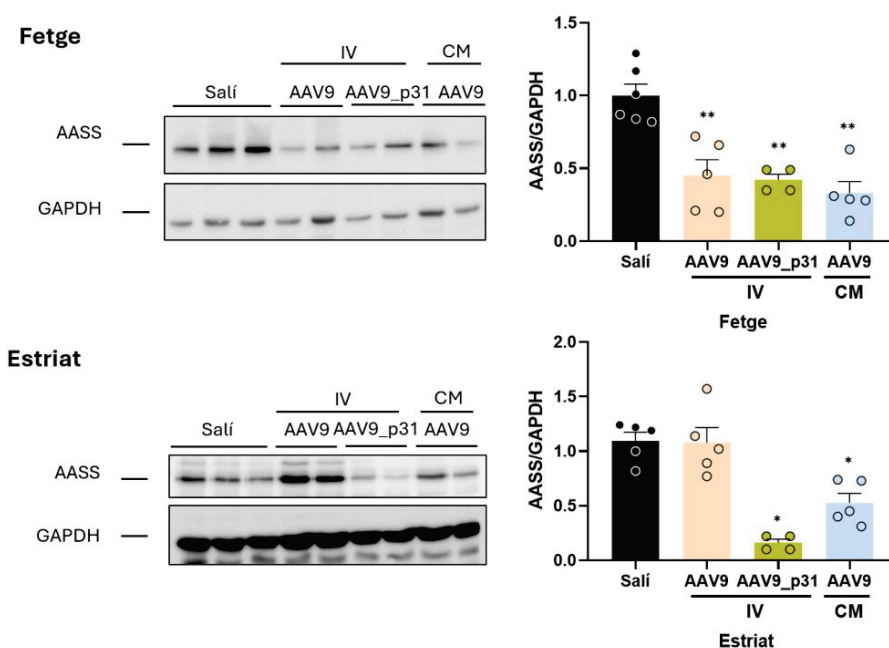


Figura 4.9. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells d'expressió de proteïna alfa-aminoadipic semialdehid sintasa (AASS) després de l'administració dels vectors AAV9_miR_AASS (AAV9) i AAV9_p31_miR_AASS (AAV9_p31) a dia 30 post-natal (P30). Anàlisi per *western blot* d'AASS en fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, AAV9 i AAV9_p31 via intravenosa (IV), i AAV9 via cisterna magna (CM). Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=6-8 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

L'expressió d'AASS en fetge es va observar significativament reduïda en els animals tractats en les tres aproximacions d'administració de l'AAV_miR_AASS. Mentre que en estriat, l'administració IV amb l'AAV9_p31 reduïa l'expressió de la proteïna un 70%, i l'AAV9 per via CM un 50%. No es va observar cap efecte en la reducció de proteïna amb l'administració del vector AAV9 per via IV (Figura 4.9). Aquests resultats correlacionaven amb els nivells de miR_AASS madur que es van detectar en les respectives condicions. L'administració del vector AAV9 per via IV va ser l'única estratègia que no va donar lloc a una expressió suficient de miR_AASS capaç d'inhibir l'expressió de la proteïna AASS en estriat.

Per tal d'avaluar l'impacte de la inhibició de l'AASS sobre les alteracions associades a l'AG1 en els ratolins *Gcdh*^{-/-}, es varen quantificar els nivells d'àcids dicarboxílics (GA i 3-OHGA) que s'acumulen en SNC i teixits perifèrics en l'AG1. En fetge i sèrum, es va observar una reducció de GA i 3-OHGA en totes tres aproximacions respecte al grup *Gcdh*^{-/-} salí, correlacionant-se amb la disminució de la expressió d'AASS. La tendència similar entre els nivells de metabòlits en teixits perifèrics estaria d'acord amb el fet que el flux de metabòlits circulants al torrent sanguini és un reflex del que s'acumula al fetge. Per contra, en estriat l'administració amb l'AAV9_p31 va ser la única estratègia capaç de disminuir de forma significativa els nivells de metabòlits, concretament en 3-OHGA, en línia amb la notable disminució de la expressió de l'AASS. En canvi, la reducció del 50% de proteïna que es va observar en administrar l'AAV9 per via CM no seria suficient per reduir els nivells de GA i 3-OHGA. L'administració de l'AAV9 IV no va mostrar disminució dels nivells de metabòlits, en consonància amb l'absència d'inhibició de la expressió de AASS (Figura 4.10).

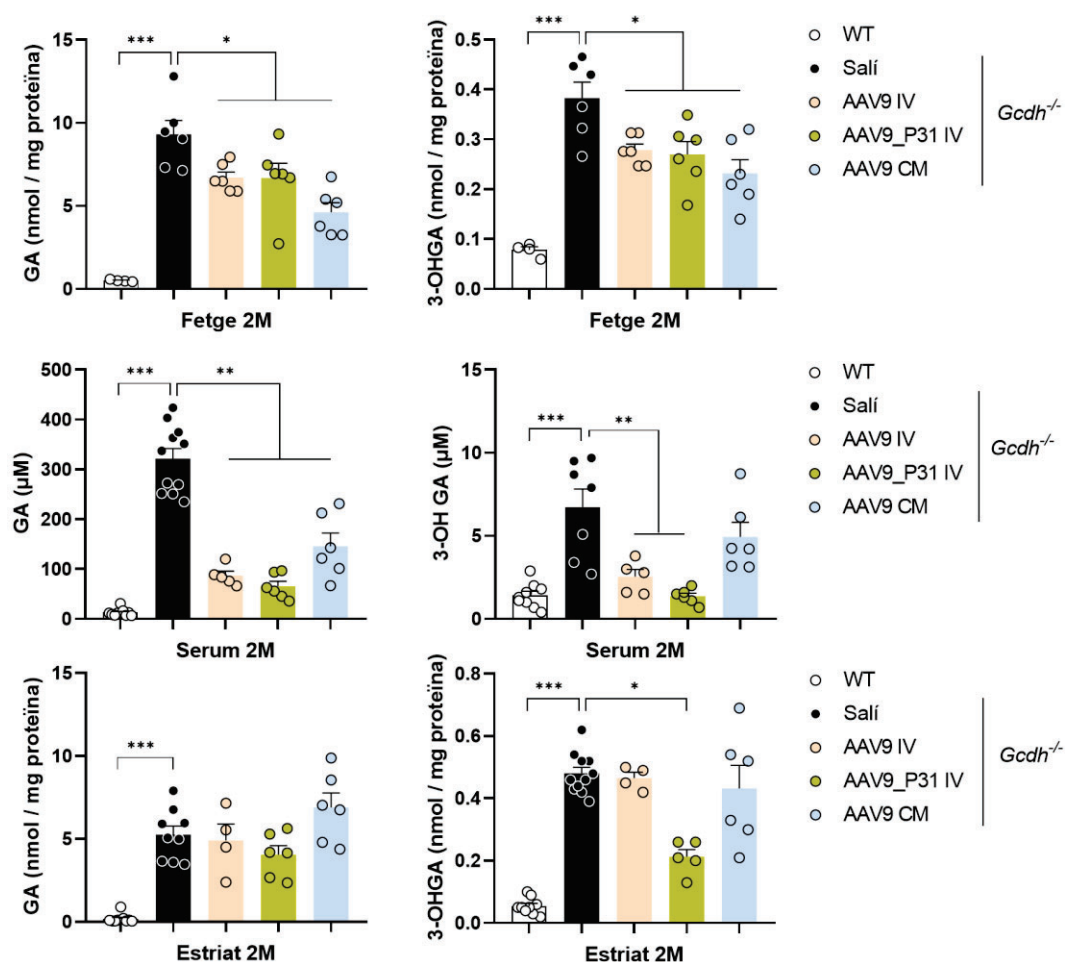


Figura 4.10. Anàlisis 1 mes post-tractament dels nivells de àcid glutàric (GA) i 3-hidroxiglutàric (3-OHGA) després de l'administració dels vectors AAV9_miR_AASS (AAV9) i AAV9_p31_miR_AASS (AAV9_p31) a dia 30 post-natal (P30). Quantificació de GA i 3-OHGA en fetge, sèrum i estriat de ratolins. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí, AAV9 administrat per via intravenosa (IV), AAV9_p31 per via IV i AAV9 administrat per via cisterna magna (CM). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-8 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

En conjunt, l'administració del vector terapèutic en edat jove-adulta va demostrar en tots els casos tenir un efecte a nivell perifèric. Tanmateix, l'administració de l'AAV9 no té suficient capacitat per creuar la BHE, i conseqüentment no és capaç de reduir l'acumulació de metabòlits neurotòxics (GA i 3-OHGA) en el SNC. L'administració a CM, tot i aconseguir una millor inhibició de la AASS en estriat, tampoc va aportar una correcció en el contingut de metabòlits. Només l'administració del vector AAV9_p31 via IV permetia reduir el contingut en 3-OHGA de forma significativa en estriat. Tot i els bons resultats obtinguts amb aquest vector no es van prosseguir els estudis ja que no hi ha evidències científiques de la seva funcionalitat en humans. De fet, es coneix que l'AAV9_p31 interactua de forma molt eficient amb l'anhidrasa carbònica tipus IV de ratolí, però no amb la humana (Zhang et al., 2024).

4.2.2. Estudi de l'administració de l'AAV9_miR_AASS a edat jove dia 15 post-natal (P15)

Donat que a edats primerenques en ratolins i humans la BHE no està del tot desenvolupada, i que en administrar l'AAV9 a P30 no es va aconseguir un efecte terapèutic a nivell de SNC, es va explorar l'administració en una edat més jove i una dosi més alta (dia 15 post-natal, P15). Es va injectar una dosi de $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg, i es van estudiar dues vies d'administració de l'AAV9, la via sistèmica IV per la vena de la cua i la via locoregional per injecció a CM.

De la mateixa manera que en l'administració a P30, es va analitzar la transducció dels teixits de fetge i estriat amb el vector terapèutic mitjançant la quantificació de molècules de miR_AASS madur en ratolins *Gcdh*^{-/-}.

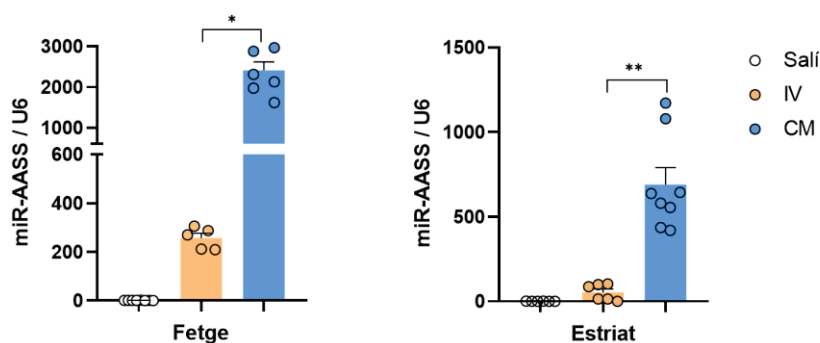


Figura 4.11. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells de miR_AASS madur després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 15 post-natal (P15). Quantificació de molècules de miR_AASS madur en lisats de fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, AAV9 administrat per via intravenosa (IV) i per via cisterna magna (CM). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-8 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La detecció de miR_AASS madur va confirmar que a P15 ambdues administracions sistèmica i locoregional de l'AAV9 tenen arribada a fetge. En línia amb els resultats obtinguts a P30, l'administració via CM va demostrar una òptima arribada del vector al fetge, indicant que tot i que l'AAV9 s'administri de forma local aquest difon fora del SNC amb alt tropisme cap al fetge (Dirren et al., 2014). Pel que fa a la regió estriatal, a través de l'administració de l'AAV9 a CM es varen detectar alts nivells de còpies de miR_AASS madur. Mentre que pràcticament no es va detectar miR_AASS madur després de l'administració IV (Figura 4.11).

A continuació, es va analitzar l'efecte terapèutic de l'AAV9 sobre la inhibició de l'AASS en fetge i estriat.

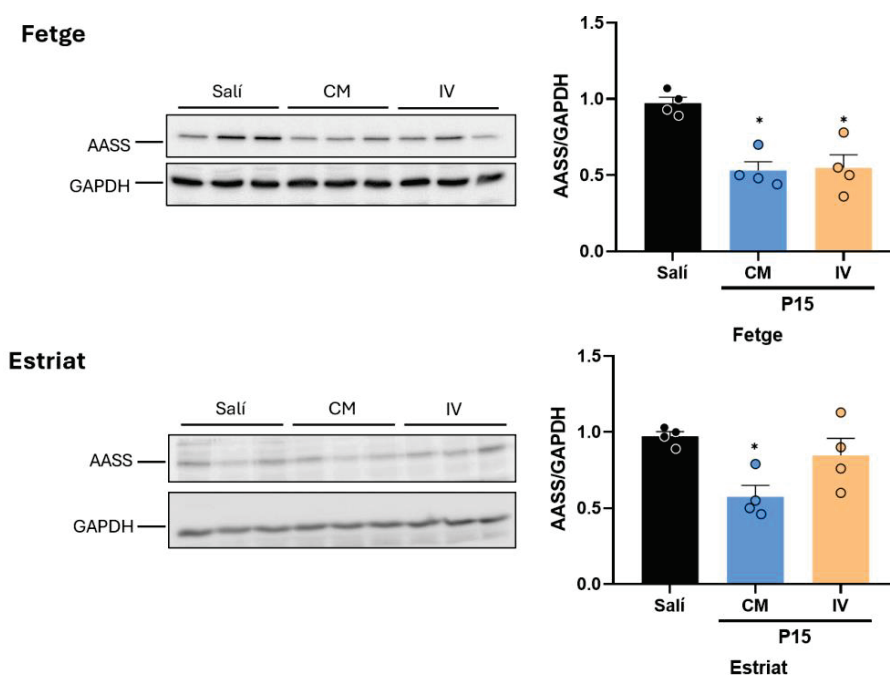


Figura 4.12. Anàlisis 1 mes post-tractament dels nivells d'expressió de proteïna alfa-aminoadipic semialdehid sintasa (AASS) després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 15 post-natal (P15). Anàlisis per *western blot* de la expressió de l'AASS en fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, AAV9_miR_AASS (AAV9) administrat per via cisterna magna (CM) i per via intravenosa (IV). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=4-6 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En fetge, es va observar una reducció en l'expressió de l'AASS en els animals tractats amb les dues vies d'administració de l'AAV9. Quant a l'estriat, únicament l'administració del vector via CM reduïa de forma significativa l'expressió proteica d'AASS (Figura 4.12). Aquests resultats es van mostrar consistents amb l'anàlisi de l'expressió de molècules de miR_AASS madur, suggerint que sense una òptima arribada al teixit no hi ha efecte sobre la inhibició de la proteïna.

En darrer terme, es va explorar l'efecte de les administracions de l'AAV9_miR_AASS a P15 en l'acumulació de metabòlits.

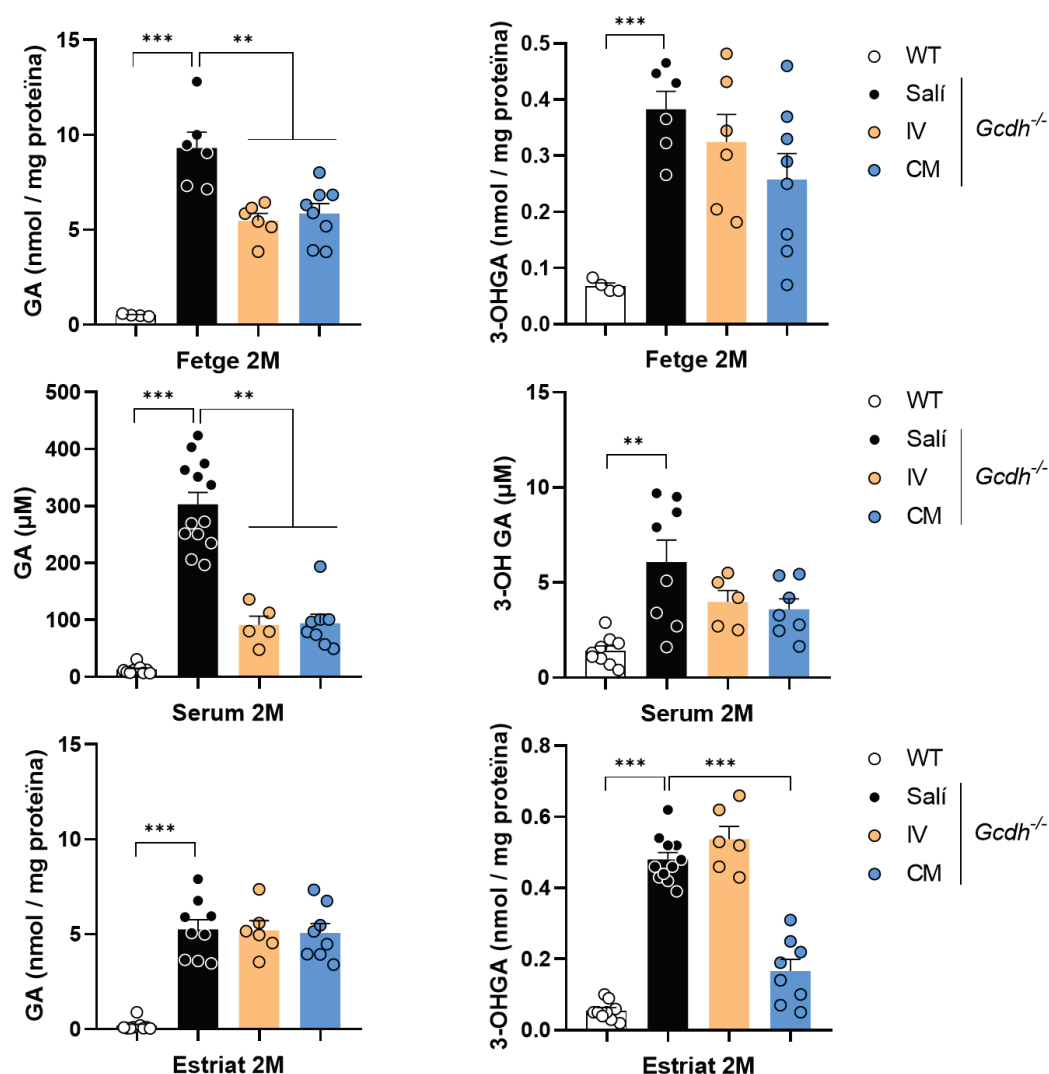


Figura 4.13. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells de àcid glutàric (GA) i 3-hidroxiglutàric (3-OHGA) després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 15 post-natal (P15). Quantificació del GA i del 3-OHGA en fetge, sèrum i estriat de ratolins. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh* -/- salí, AAV9_miR_AASS (AAV9) administrat per via intravenosa (IV) i per via cisterna magna (CM). Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-8 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En fetge i sèrum, les administracions IV i CM van mostrar una reducció estadísticament significativa de GA, i una tendència en la disminució del 3-OHGA. En el nucli estriatal, únicament amb l'administració locoregional es va detectar una reducció significativa de 3-OHGA, respecte al grup *Gcdh* -/- no tractat (Figura 4.13). Tots aquests resultats es correlacionaven amb els nivells d'expressió de l'AASS detectats en cada condició, mostrant que a major reducció dels nivells d'expressió de l'AASS es donava una menor acumulació de metabòlits.

En conjunt, aquests resultats van demostrar que l'administració a P15 per via CM permetia millorar la transducció del vector a SNC, respecte a l'administració homòloga a P30 el que comportava un major efecte en la inhibició d'AASS i en la prevenció d'acumulació de 3-OHGA, però no del GA. Tanmateix, la dosi administrada a P15 era superior a la de P30 pel que no és possible concloure si l'efecte de millora era degut a l'edat més primerenca de l'administració, a la dosi més alta o a un efecte combinat dels dos.

La via IV a P15, no va mostrar cap millora significativa respecte a la mateixa administració a P30 tot i la dosi més alta, reiterant la ineficiència de l'AAV9 en la transducció al SNC. Conseqüentment, es va considerar com a alternativa l'exploració d'una via administració IV encara a una edat encara més primerenca, en la qual la BHE no s'hagi acabat de formar.

4.2.3. Estudi de l'administració de l'AAV9_miR_AASS a edat neonatal (P1) per via intravenosa (IV)

Amb l'objectiu d'administrar en l'edat més primerenca, es va estudiar l'administració de l'AAV9_miR_AASS en edat neonatal (dia 1 post-natal -P1) moment en el qual la BHE encara no s'ha acabat de formar. Es van generar dos grups experimentals contemplant dues dosis d'administració: dosi baixa ($7,5 \times 10^{12}$ vg/kg) equivalent a l'administrada en els estudis a P30 i dosi alta (5×10^{13} vg/kg).

Tal i com es va dur a terme en les altres estratègies d'administració, es va analitzar la biodistribució del vector terapèutic mitjançant la quantificació de miR_AASS madur.

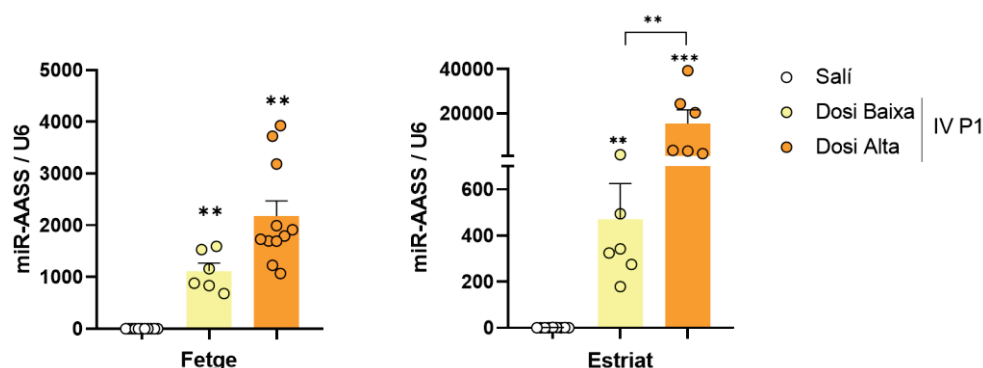


Figura 4.14. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells de miR_AASS madur després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 1 post-natal (P1). Quantificació de molècules de miR_AASS madur en lisats de fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, Dosi Baixa d'AAV9 IV P1, i Dosi Alta d'AAV9 IV P1. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=6-9 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

La mesura de miR_AASS madur va confirmar la òptima biodistribució de l'administració neonatal en fetge i estriat, sent els nivells de detecció dosi dependent (Figura 4.14). Comparant l'arribada de l'AAV9 al SNC d'ambdues dosis, els nivells de la dosi baixa es van equiparar a l'eficiència de transducció de les administracions del mateix vector per via CM a P15, tot i ésser més baixa la dosi administrada ($7,5 \times 10^{12}$ vg/kg IV P1 vs $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg CM P15). La quantitat detectada en la dosi alta es va assimilar als valors de transducció de l'administració IV a P30 del serotip modificat AAV9_p31.

Un cop comprovada l'arribada de l'AAV9_miR_AASS als teixits d'estudi, es va analitzar la capacitat de miR_AASS de modular els nivells d'expressió de la proteïna AASS en fetge i estriat.

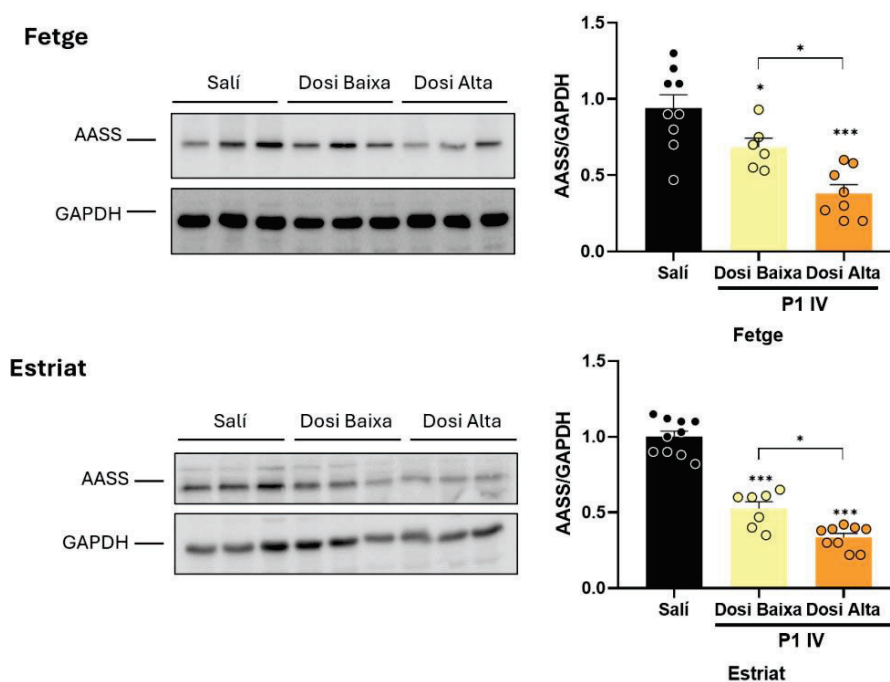


Figura 4.15. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells d'expressió de proteïna alfa-aminoacid semialdehid sintasa (AASS) després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 1 post-natal (P1). Anàlisi de *western blot* d'AASS en fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, d'AAV9 IV P1, i Dosi Alta d'AAV9 IV P1. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-9 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

L'anàlisi de l'expressió de proteïna d'AASS en fetge i estriat, va indicar que les dues dosis reduïen l'expressió en els dos teixits. Cal remarcar, que la disminució induïda per part de l'administració de la dosi alta va ser significativament superior a la dosi baixa, seguint un patró de dosi-dependència tal i com s'havia observat amb els nivells de miR_AASS madur. La dosi alta va induir una disminució dels nivells d'AASS del 60% en fetge i 70% en estriat, mentre la reducció a dosi baixa va ser del 35% en fetge i 50% en estriat (Figura 4.15).

A continuació, es va explorar l'impacte d'aquesta estratègia sobre l'acumulació d'àcids dicarboxílics (GA i 3-OHGA) en fetge, sèrum i estriat.

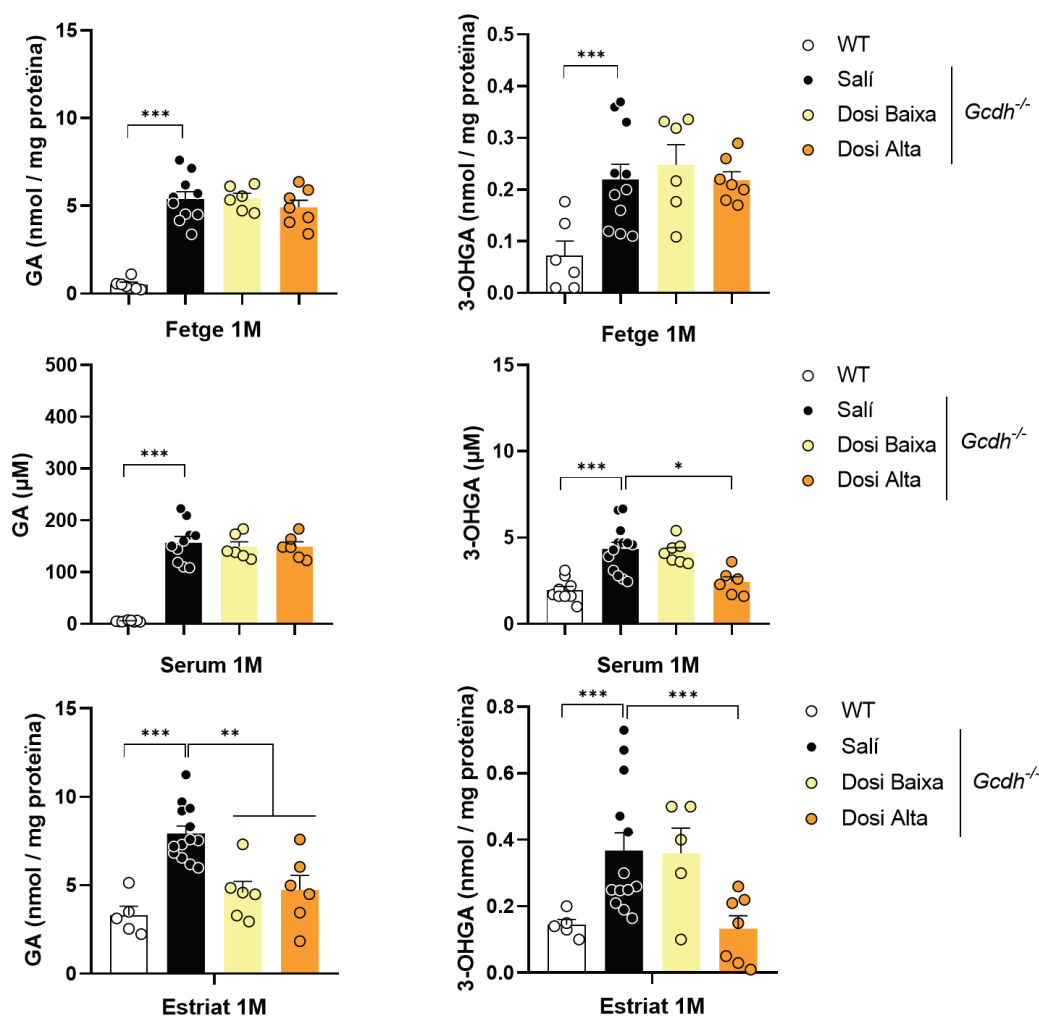


Figura 4.16. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells de àcid glutàric (GA) i 3-hidroxi glutàric (3-OHGA) després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 1 post-natal (P1). Quantificació d'àcid glutàric (GA) i 3-hidroxi glutàric (3-OHGA) en fetge, sèrum i estriat de ratolins. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí, d'AAV9 IV P1, i Dosi Alta d'AAV9 IV P1. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=5-9 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Els nivells de metabòlits en fetge després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS no van mostrar diferències respecte la condició *Gcdh*^{-/-} salina en cap de les dues dosis. Una tendència similar es va observar en el sèrum; no obstant això, es va observar una disminució significativa dels nivells de 3-OHGA en el grup experimental tractat amb la dosi alta de l'AAV9. Mentre que en l'estriat, la dosi baixa va induir la disminució significativa de GA i la dosi alta va reduir significativament l'acumulació dels dos metabòlits neurotòxics (Figura 4.16).

Així doncs, aquests resultats van permetre seleccionar l'administració neonatal intravenosa de l'AAV9_miR_AASS a dosi 5×10^{13} vg/kg, com a administració amb millor biodistribució i eficiència de reducció sobre el contingut de metabòlits al SNC,

concretament al nucli estriat, l'òrgan diana per la teràpia d'AG1. D'aquí en endavant es va treballar amb aquesta administració i dosi.

4.2.4. Estudi a llarg termini de l'administració de l'AAV9_miR_AASS a edat neonatal (P1) per via intravenosa (IV)

A continuació, es va estudiar l'estabilitat del silenciament de l'AASS i els efectes sobre l'acumulació dels metabòlits neurotòxics a llarg termini. Així doncs, es va generar un grup experimental de ratolins tractats amb el vector terapèutic AAV9_miR_AASS a edat neonatal per via IV, que posteriorment es van eutanasiar sis mesos post-tractament per recol·lectar-ne sèrum, fetge i estriat.

Es va avaluar la capacitat de miR_AASS per mantenir el silenciament de l'expressió de la proteïna AASS al cap de sis mesos de l'administració, en fetge i estriat.

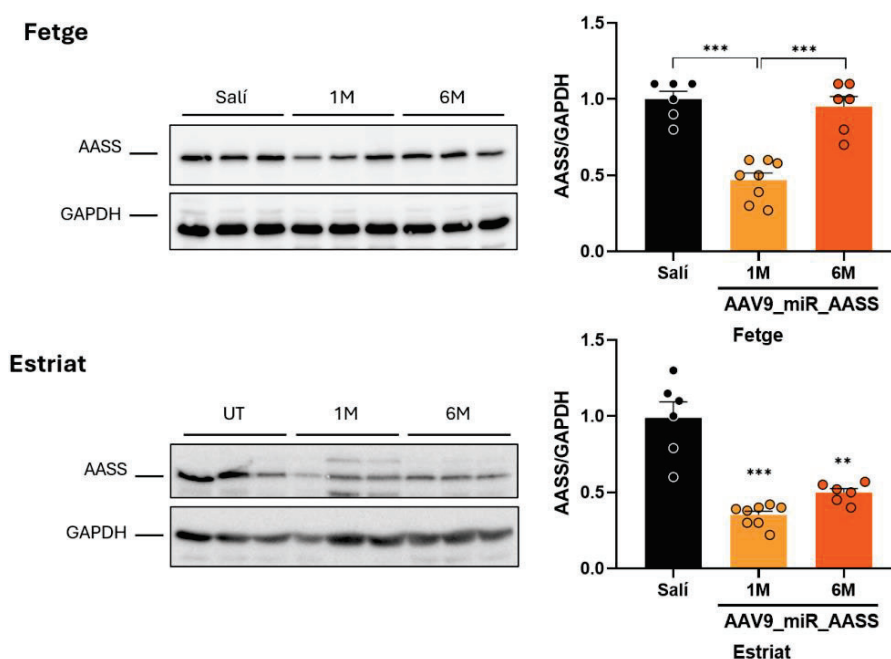


Figura 4.17. Anàlisi dels nivells d'expressió a curt (1M) i llarg termini (6M) de la proteïna alfa-aminoadípica semialdehid sintasa (AASS) després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 1 post-natal (P1). Anàlisi de *western blot* d'AASS en fetge i estriat. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, d'AAV9 1M, i d'AAV9 6M. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

L'anàlisi de l'expressió de proteïna d'AASS va indicar que en fetge, els nivells d'expressió de l'AASS en el grup tractat a llarg termini (6M) eren significativament superiors als de curt termini (1M), assimilant-se als valors de l'AASS en condició salina. Per contra, en estriat, els nivells d'expressió a sis mesos es van mantenir

reduïts de forma similar als d'un mes post-tractament. Els resultats evidenciaven que al cap de sis mesos de la transducció dels miRNA, aquests mantenien la seva capacitat d'induir el silenciament post-transcripcional a l'estriat però no en fetge (Figura 4.17).

En paral·lel, es va explorar l'impacte del tractament a llarg termini de l'administració IV neonatal sobre l'acumulació de GA i 3-OHGA en fetge, sèrum i estriat.

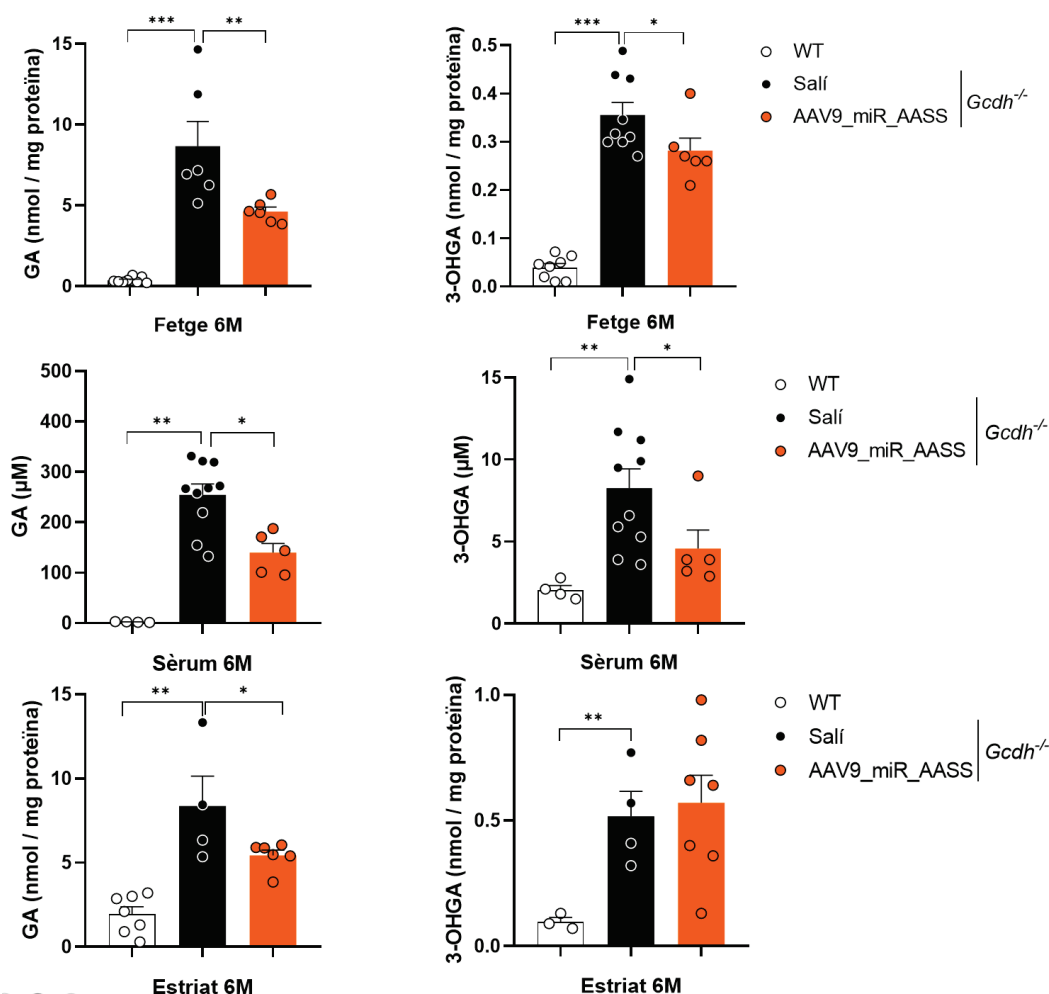


Figura 4.18. Anàlisi 6 mesos post-tractament (6M) dels nivells de àcid glutàric (GA) i 3-hidroxiglutàric (3-OHGA) després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) a dia 1 post-natal (P1). Quantificació del GA i del 3-OHGA en fetge, sèrum i estriat de ratolins. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh* ^{-/-} salí, d'AAV9 IV P1. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=4-10 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Els nivells de metabòlits en teixits perifèrics, fetge i sèrum, van demostrar que a sis mesos post-tractament de l'AAV9_miR_AASS reduïa significativament els valors de GA i 3-OHGA. Cal destacar, que a un mes post-tractament, en aquests teixits no es va observar reducció dels nivells de metabòlits en el grup tractat respecte al salí

(Figura 4.16). Tanmateix, comparant la condició *Gcdh*^{-/-} salina a curt (1M) i llarg termini (6M), es va mostrar un augment del 30% de l'acumulació dels metabòlits al llarg d'aquest període de cinc mesos. Això indicaria que, el potencial terapèutic de l'AAV9_miR_AASS als sis mesos post-tractament permetria prevenir d'aquest augment que es dona al grup no tractat als sis mesos d'edat dels ratolins. En estriat, el grup *Gcdh*^{-/-} tractat va mostrar una disminució significativa únicament en els nivells GA respecte l'homòleg salí (Figura 4.18).

En resum, l'avaluació de la capacitat terapèutica de l'AAV9_miR_AASS als sis mesos post-tractament, va evidenciar que en fetge tot i no mantenir la inhibició de l'expressió de la proteïna AASS, prevenia de l'acumulació dels metabòlits dicarboxílics que es dona en ratolins *Gcdh*^{-/-} als sis mesos d'edat. En canvi, en SNC, es va mantenir el silenciament de l'expressió de la proteïna AASS fins als sis mesos post-administració, i conseqüentment la teràpia permetia controlar, almenys parcialment l'augment de metabòlits.

4.2.5. Estudi de l'especificitat i efectes *off-target* de l'AAV9_miR_AASS *in vivo*

Prèviament s'havia demostrat, en estudis *in vitro*, l'especificitat de la inhibició de l'AASS pel miR_AASS en relació a la mateixa seqüència *scrambled* miR_Sc. A continuació, es va voler comprovar que aquesta especificitat també es mantenia després de l'administració *in vivo* del vector AAV9_miR_AASS en comparació a l'AAV9_miR_Sc. Es va generar un nou grup experimental administrant l'AAV9_miR_Sc via IV a edat neonatal (P1) a dosi alta: 5×10^{13} vg/kg.

Per una banda, per tal d'avaluar l'especificitat del vector terapèutic, es van analitzar els nivells d'expressió de l'AASS després d'un mes d'administració de l'AAV9_miR_AASS i l'AAV9_miR_Sc. Per altra, es va explorar la presència o no d'efectes *off-target*, mitjançant l'anàlisi de l'expressió de dues proteïnes: membre 4 de la família del domini d'associació Ras (RASSF4, per les seves sigles en anglès) i anular 3 del grup Polycomb (PCGF3, per les seves sigles en anglès). Aquestes proteïnes es van seleccionar com a susceptibles de patir efectes *off-target* no desitjats, degut a que la seva seqüència codificant en ratolí compartia un 100%

d'homologia en un 68% de la seqüència i un 94% d'homologia en un 81% de la seqüència respectivament, amb la seqüència diana de reconeixement del miR_AASS.

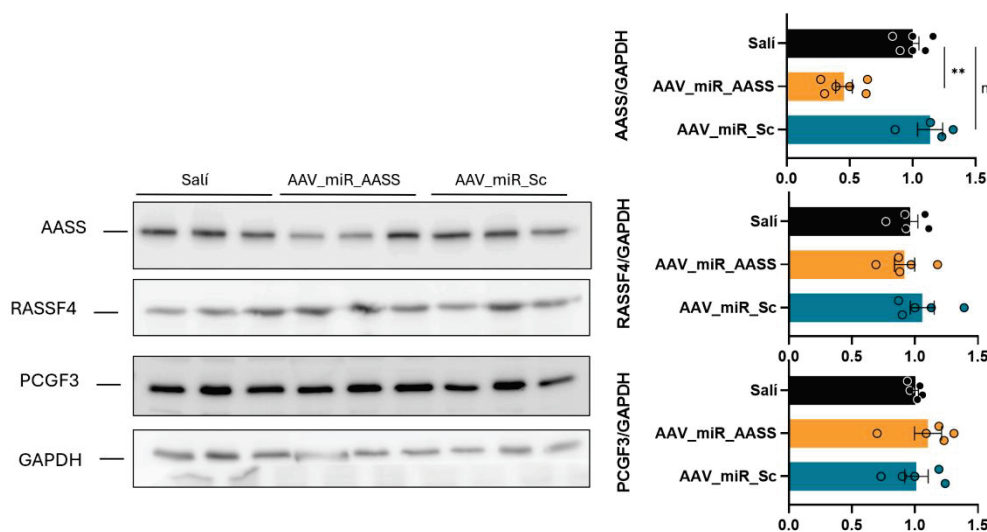


Figura 4.19. Anàlisi 1 mes post-tractament dels nivells d'expressió de les proteïnes alfa-aminoadípica semialdehid sintasa (AASS), membre 4 de la família del domini d'associació Ras (RASSF4) i anular 3 del grup Polycomb (PCGF3) en administracions de l'AAV9_miR_AASS i l'AAV9_miR_Sc a 1 dia post-natal (P1). Anàlisi per *western blot* de la proteïna d'AASS en fetge. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, AAV9_miR_AASS i AAV9_miR_Sc. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=5 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En l'estudi de l'expressió d'AASS es va observar que l'expressió d'AASS es mantenia similar entre el grup AAV9_miR_Sc i el grup *Gcdh*^{-/-} salí, mentre que l'AAV9_miR_AASS en reduïa l'expressió. Així, es va confirmar que la modulació post-transcripcional de l'AASS era específica de l'acció de l'AAV9_miR_AASS, i l'AAV9_miR_Sc es comportava com a vector control (Figura 4.19).

Pel que fa a l'anàlisi de RASSF4 i PCGF3, els valors d'expressió de les dues proteïnes no van variar ni amb l'administració de l'AAV9_miR_AASS, ni amb l'administració de l'AAV9_miR_Sc respecte al grup salí (Figura 4.19). Això va indicar, que ni el vector terapèutic ni el control, exercien cap efecte *off-target* no desitjat sobre el nivell d'expressió d'aquestes proteïnes *in vivo*.

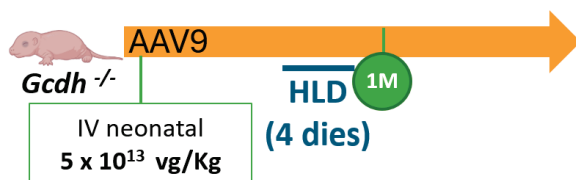
4.3. Estudi de l'eficàcia terapèutica d'una administració neonatal del vector AAV9_miR_AASS en ratolins *Gcdh*^{-/-} en un context d'exposició a dieta alta en lisina

Una vegada seleccionada l'administració intravenosa neonatal (P1) com a estratègia terapèutica òptima per a l'arribada i efectivitat al SNC, es va aprofundir en el coneixement de la fisiopatologia de l'AG1 i el corresponent efecte terapèutic de l'AAV9_miR_AASS.

Tal i com ja s'ha descrit, el model murí *Gcdh*^{-/-} ha d'exposar-se just després del deslletament a una dieta alta en proteïna, o bé lisina (HLD – 4,7% Lisina), per tal de recapitular la lesió estriatal que té lloc en pacients amb AG1. Aquesta dieta força i augmenta el catabolisme de la lisina, provocant un increment en l'acumulació de GA i 3-OHGA, i un conjunt d'alteracions neuropatològiques, que comprometen la supervivència dels animals en un 50% (Zinnanti et al. 2006, 2007).

D'aquí en endavant, es va treballar amb grups experimentals alimentats amb dieta estàndard (SD, per les seves sigles en anglès - 0,9% Lisina) o bé dieta alta en lisina (HLD, per les seves sigles en anglès - 4,7% Lisina), a curt (1 mes post-tractament) i llarg termini (6 mesos post-tractament). En els grups a curt termini: a P1 als animals se'ls va administrar (o no, grup salí) el vector terapèutic (AAV9_miR_AASS), a P21 es van deslletar i exposar durant 4 dies a SD o HLD, posteriorment es varen eutanasiar per recol·lectar els teixits d'interès. Pel que fa als grups a llarg termini, després de l'administració (o no, grup salí) a P1 i el posterior deslletament a P21, es van mantenir fins als sis mesos d'edat amb dieta SD o HLD (Figura 4.20).

A



B



Figura 4.20. Representació esquemàtica dels grups experimentals in vivo exposats a dieta alta en lisina (HLD). A) Condició a curt termini: administració intravenosa a dia 1 post-natal (P1) de l'AAV9_miR_AASS (AAV9). Els animals es van exposar a HLD just després del deslletament i es van eutanasiar 4 dies després. B) Condició a llarg termini: administració intravenosa P1 de l'AAV9. Els animals es van exposar a HLD just després del deslletament i es van eutanasiar 5 mesos després.

4.3.1. Impacte de l'exposició a dieta alta en lisina en l'expressió de l'AASS

Tenint en compte que la lisina, conjuntament amb l' α -cetoglutarat, són el substrat del domini LKR de l'AASS, es va estudiar la possible modulació d'aquest enzim en condicions d'exposició a HLD. Es va analitzar l'expressió de proteïna AASS en mostres de fetge i estriat de ratolins WT i *Gcdh*^{-/-} alimentats durant 4 dies post-deslletament a SD o bé HLD.

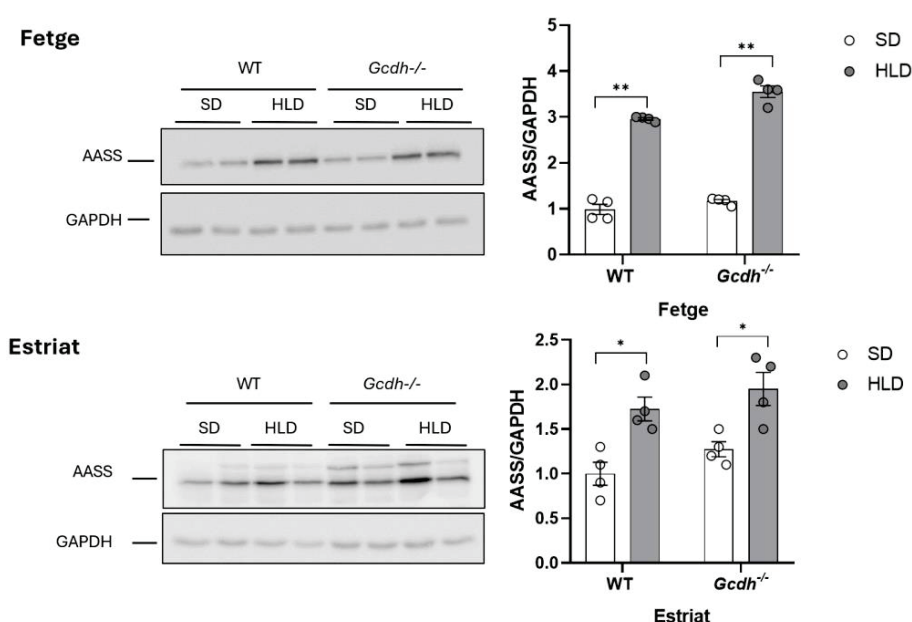


Figura 4.21. Anàlisi a 1 mes d'edat dels nivells d'expressió de proteïna alfa-aminoadípica semialdehid sintasa (AASS) en animals *wild-type* (WT) i *Gcdh*^{-/-} exposats a dieta estàndard de lisina (SD) o dieta alta en lisina (HLD). Anàlisi de *western blot* d'AASS en fetge i estriat, els animals es van sotmetre a 4 dies d'exposició post-deslletament a SD o HLD. Grups experimentals: WT i *Gcdh*^{-/-} ± HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM, n=4 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

L'anàlisi de l'expressió de proteïna AASS en context de HLD va demostrar que en fetge i estriat es donava un augment significatiu dels nivells d'AASS respecte la condició SD, tant en animals WT com en *Gcdh*^{-/-} (Figura 4.21). Aquests resultats recolzaven evidències ja descrites prèviament, en que es va detectar una inducció de l'activitat hepàtica del domini LKR de l'AASS en ratolins alimentats amb dieta rica en proteïna, degut a una regulació post-transcripcional (Kiess et al. 2008).

En aquest punt, es va plantejar el dilema de si la proposta d'aproximació terapèutica seria suficientment potent com per reduir l'expressió de l'AASS en un context de HLD en el que s'estava induint un augment dels nivells d'aquesta proteïna. Per comprovar-ho, es van analitzar els valors d'expressió de l'AASS en fetge i estriat de dos grups experimentals tractats amb l'AAV9_miR_AASS IV a P1, i exposats a HLD durant 4 dies (eutanasiat a 1 mes post-tractament) o cinc mesos post-deslletament (eutanasiat a 6 mesos post-tractament).

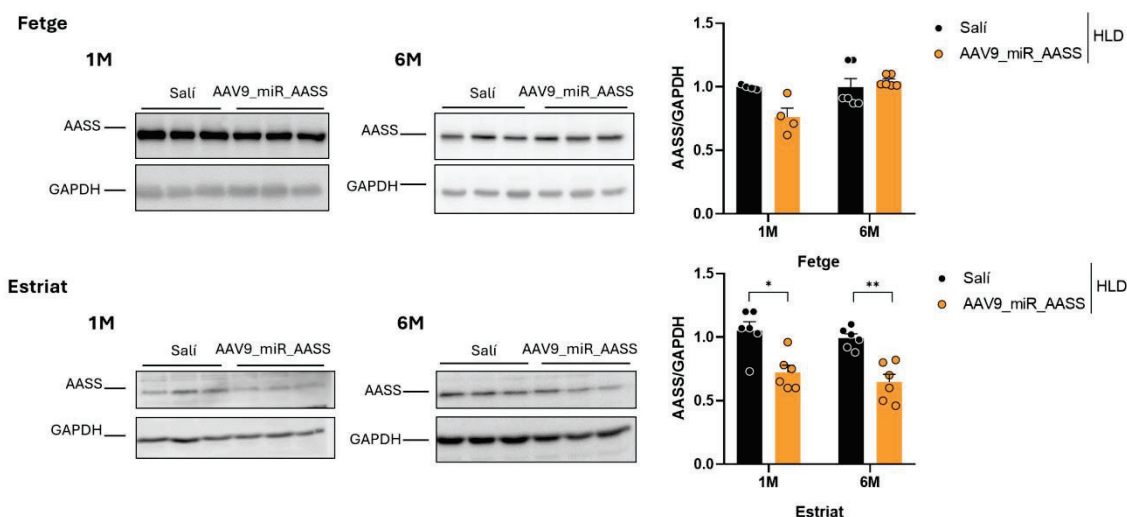


Figura 4.22. Anàlisi a 1 i 6 mesos post-tractament dels nivells d'expressió de proteïna alfa-aminoadípica semialdehid sintasa (AASS) en animals *Gcdh*^{-/-} tractats amb l'AAV9_miR_AASS i exposats a dieta alta en lisina (HLD). Anàlisi de *western blot* d'AASS en fetge i estriat, els animals es van sotmetre a 4 dies o cinc mesos d'exposició post-deslletament a HLD. Grups experimentals *Gcdh*^{-/-}: salí, i amb la administració de l'AAV9_miR_AASS. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=4-6 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

L'estudi d'expressió proteica en condicions d'alimentació amb HLD en fetge, va revelar que al grup tractat amb l'AAV9_miR_AASS hi havia certa tendència a la disminució dels nivells d'AASS, però no era estadísticament significativa a un mes post-tractament. Als sis mesos, no es va observar cap efecte d'inhibició de l'AASS per part del vector terapèutic. Per contra, en la regió estriatal es va detectar una reducció significativa en l'expressió d'AASS posterior a la administració de l'AAV9_miR_AASS respecte els grups homòlegs salins al mes post-administració que es mantenia a llarg termini, tot i els 5 mesos d'exposició a HLD (Figura 4.22). Aquests resultats suggerien que l'efecte del vector terapèutic en estriat era suficientment potent com per contrarestar la inducció d'AASS induïda per HLD.

4.3.2. Anàlisi sobre l'acumulació de metabòlits

L'exposició a dieta alta en lisina (HLD) en models de rata i ratolí d'AG1 provoca una activació de la via del catabolisme de la lisina, que indueix un increment de GA i 3-OHGA en teixits perifèrics i en el cervell, concretament en el nucli estriat. Aquests compostos dicarboxílics queden retinguts al SNC degut a la incapacitat per creuar la BHE, contribuint a la neuropatologia de l'AG1 (Gonzalez Melo et al., 2021b; Sauer et al., 2015; Zinnanti et al., 2006).

Considerant la rellevància de l'acumulació de metabòlits en el fenotip de l'AG1, es va estudiar l'efecte de l'administració intravenosa neonatal de l'AAV9_miR_AASS a nivell bioquímic en el context de HLD exposats durant 4 dies o 5 mesos i coincidint amb 1 mes (1M) després de l'administració de la teràpia o 6 mesos (6M) .

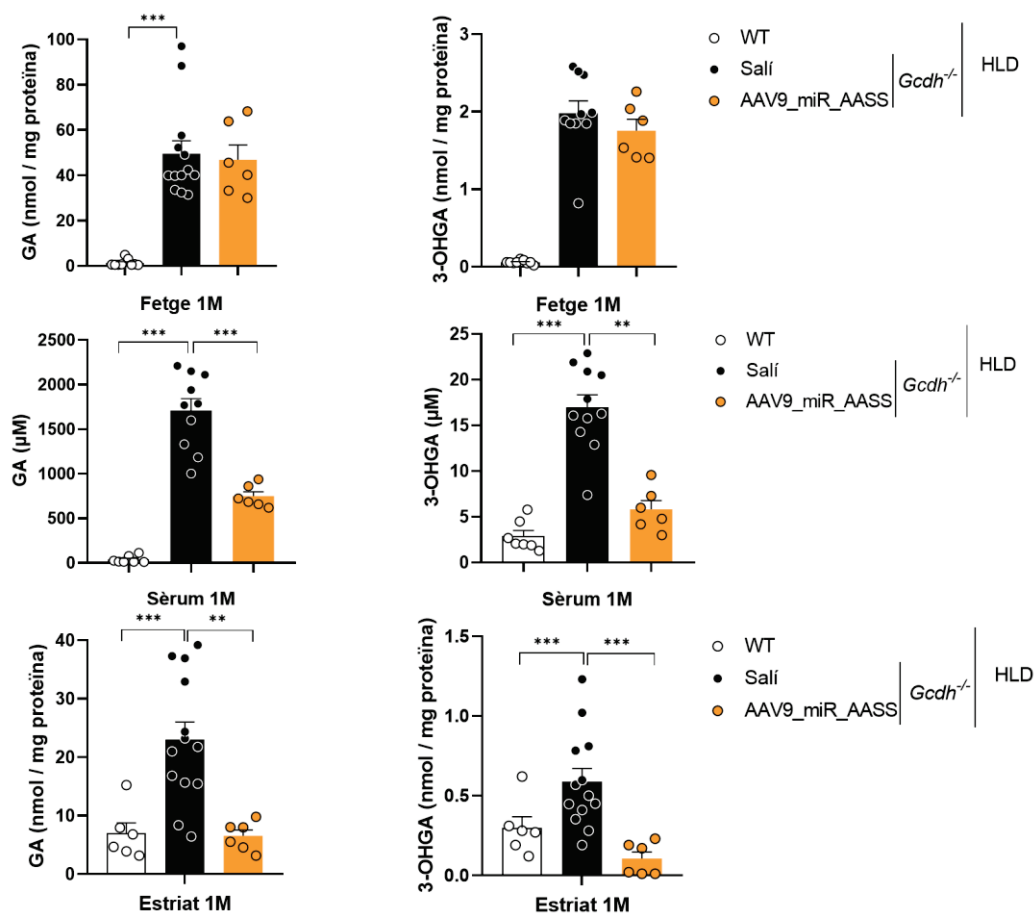


Figura 4.23. Anàlisi a 1 mes post-tractament dels nivells de metabòlits després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) en context de dieta alta en lisina (HLD). Quantificació d'àcid glutàric (GA) i 3-hidroxiglutàric (3-OHGA) en fetge, sèrum i estriat de ratolins. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a dieta alta en lisina (HLD) durant 4 dies post-deslletament. Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM, n=6-9 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

En primer lloc, l'anàlisi dels metabòlits dels grups exposats durant 4 dies a HLD va mostrar que els ratolins *Gcdh*^{-/-} tenien un increment significatiu en els valors de metabòlits respecte al grup WT en tots els materials biològics estudiats, confirmant així l'efecte inductor de la dieta sobre els paràmetres bioquímics del model murí. A més, tal i com era d'esperar, l'efecte de HLD va provocar que els nivells de GA i 3-OHGA fossin significativament superiors als valors dels mateixos animals *Gcdh*^{-/-} alimentats amb SD (Figura 4.16). En teixits perifèrics, els nivells dels àcids dicarboxílics en condicions HLD van augmentar 10 vegades els seus valors respecte al mateix grup en SD, i en estriat els nivells es van doblar. Pel que fa els valors del grup tractat amb l'AAV9_miR_AASS, en les mostres del sistema perifèric es va observar una divergència en el flux de metabòlits. Mentre que en fetge no es va observar cap canvi significatiu en el grup *Gcdh*^{-/-} tractat amb el vector terapèutic respecte al salí, en sèrum, sí que es va observar una disminució significativa dels nivells de GA i 3-OHGA després de l'administració de l'AAV9. Tot i considerar que el nivell de metabòlits en sèrum és un reflex del que s'acumula al fetge, es podria hipotitzar que sent al fetge el teixit amb major activitat enzimàtica de GCDH del organisme, en aquesta condició d'anàlisi 4 dies posteriors a la inducció de la via de degradació de la lisina, el fetge encara reté una quantitat considerable dels metabòlits generats, fet que emmascara l'efecte del vector terapèutic. Per altra banda, en estriat la teràpia va reduir significativament la concentració dels dos metabòlits dicarboxílics respecte al grup no tractat, arribant a uns valors similars als de la condició WT (Figura 4.23).

L'estudi de l'exposició a HLD a llarg termini, va demostrar que en tots els teixits l'acumulació de GA i 3-OHGA era significativament superior a la dels animals WT i alhora la inducció era molt superior a la observada en els ratolins *Gcdh*^{-/-} amb SD (Figura 4.18), sent una tendència similar a la dels resultats obtinguts a curt termini. Respecte l'efecte de l'administració de l'AAV9_miR_AASS, tant en fetge com en sèrum, es va observar una reducció dels nivells de metabòlits respecte la condició no tractada, sent especialment significativa en el GA. En estriat, el vector terapèutic també va mostrar una disminució significativa dels valors de GA i 3-OHGA fins als sis mesos post-tractament (Figura 4.24).

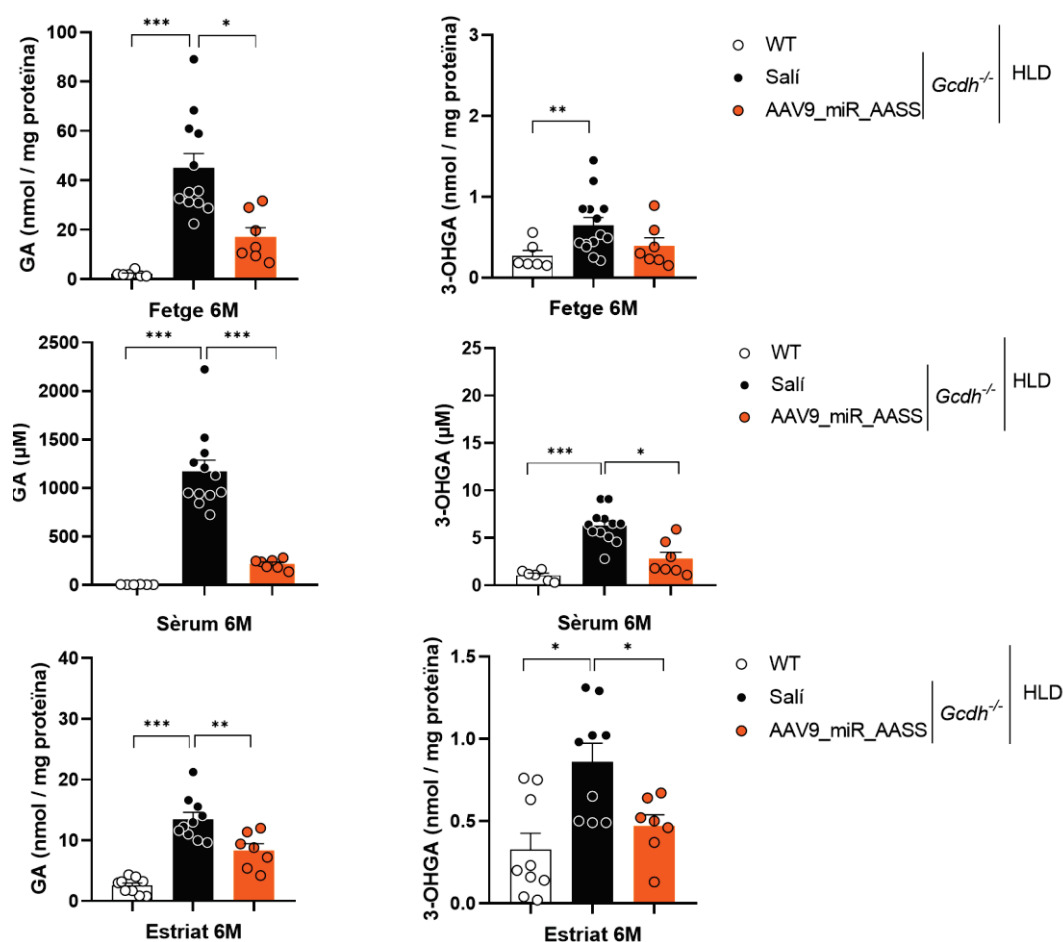


Figura 4.24. Anàlisi a 6 mesos dels nivells de metabòlits després de l'administració de l'AAV9_miR_AASS (AAV9) en context de dieta alta en lisina (HLD). Quantificació d'àcid glutàric (GA) i 3-hidroxiglutaric (3-OHGA) en fetge, sèrum i estriat de ratolins. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a dieta alta en lisina (HLD) durant 5 mesos post-deslletament. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-9 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Cal destacar que, en el grup experimental a llarg termini, tant en SD com HLD, l'efecte de l'AAV9_miR_AASS sobre la inhibició de l'expressió d'AASS es va observar únicament en estriat. Tanmateix, a nivell bioquímic el vector terapèutic va prevenir eficientment l'acumulació de metabòlits en estriat i també en teixits perifèrics. Sugerint que en context de HLD en el que l'AASS es troba sobre-expressat, tot i que la teràpia no mostra un efecte en la reducció de l'expressió de la proteïna en fetge, sí que aportaria un efecte terapèutic en el fenotip bioquímic de l'AG1 en els teixits perifèrics. Es podria especular que, tot i no mostrar silenciament post-transcripcional de l'AASS als sis mesos, al llarg d'aquest període el miR_AASS hauria estat inhibint eficientment l'expressió de l'AASS evitant l'acumulació de metabòlits tal i com es dona als *Gcdh*^{-/-} no tractats.

En conjunt, es va demostrar que l'administració intravenosa neonatal de l'AAV9_miR_AASS té un impacte terapèutic beneficiós sobre animals *Gcdh*^{-/-} en context de fenotip sever. La teràpia va aconseguir silenciar l'expressió d'AASS en el SNC fins als sis mesos post-tractament, sota un context d'inducció de via catabòlica de la lisina. Conseqüentment, va prevenir de l'acumulació de GA i 3-OHGA en teixits perifèrics i SNC de ratolins *Gcdh*^{-/-} tractats, i els efectes es van mantenir fins els sis mesos post-tractament.

4.3.3. Estudi sobre les alteracions neuropatològiques en el nucli estriat

Un 80-90% de pacients d'AG1 que no segueixen la dieta terapèutica, ja sigui per que no s'han diagnosticat mitjançant el PCN o per que l'adherència a la dieta no és l'adequada, desenvolupen crisis encefalopàtiques agudes. Durant aquestes crisis, es produeixen alteracions neuronals extenses, típicament en nucli estriatal, que resulten en un trastorn del moviment irreversible, i un dany cortical progressiu que evoluciona cap a leucodistrofia (Boy et al., 2023). Cal destacar, que en el context del cribratge neonatal on es diagnostiquen els pacients abans de l'aparició dels primers símptomes, tot i seguir el tractament dietètic, un 20% de pacients solen presentar crisis encefalopàtiques. Aquest fet posa de manifest que encara hi ha un desconeixement sobre la fisiopatologia de l'AG1 en cervell.

S'ha demostrat que en ratolins *Gcdh*^{-/-} la ingesta de HLD dona lloc a una condició similar a la humana. S'ha comparat el fenotip neuropatològic de pacients amb el dels ratolins models de la malaltia, destacant la vacuolització del nucli estriatal, la ruptura de la barrera hematoencefàlica (BHE), i la interrupció de la mielinització i la gliosi (Wajner et al. 2019; Zinnanti et al. 2006, 2007).

Per tal d'aprofundir en l'efecte de l'AAV9_miR_AASS administrat per via IV en període neonatal sobre les alteracions neuropatològiques que es donen en fenotip sever, es van realitzar anàlisis histològiques per H&E i immunohistoquímiques pels marcadors glials (GFAP), mielina (MBP) i neuronals (NeuN) en el nucli estriat.

Els estudis es van dur a terme en ratolins exposats a SD: WT, *Gcdh*^{-/-} salins i *Gcdh*^{-/-} administrats amb el vector control (AAV9_miR_Sc); i en ratolins exposats a HLD: *Gcdh*^{-/-} salins i *Gcdh*^{-/-} administrats amb el vector terapèutic (AAV9_miR_AASS). La

condició amb l'administració del vector control AAV9_miR_Sc, es va incloure amb la finalitat de detectar qualsevol possible efecte de toxicitat inespecífic i no desitjat per part de l'AAV9 a nivell neurològic. Així doncs, es van generar cinc grups experimentals eutanasiats a curt termini (1 mes post-tractament) i cinc a llarg termini (6 mesos post-tractament), sent un total de 10 grups experimentals.

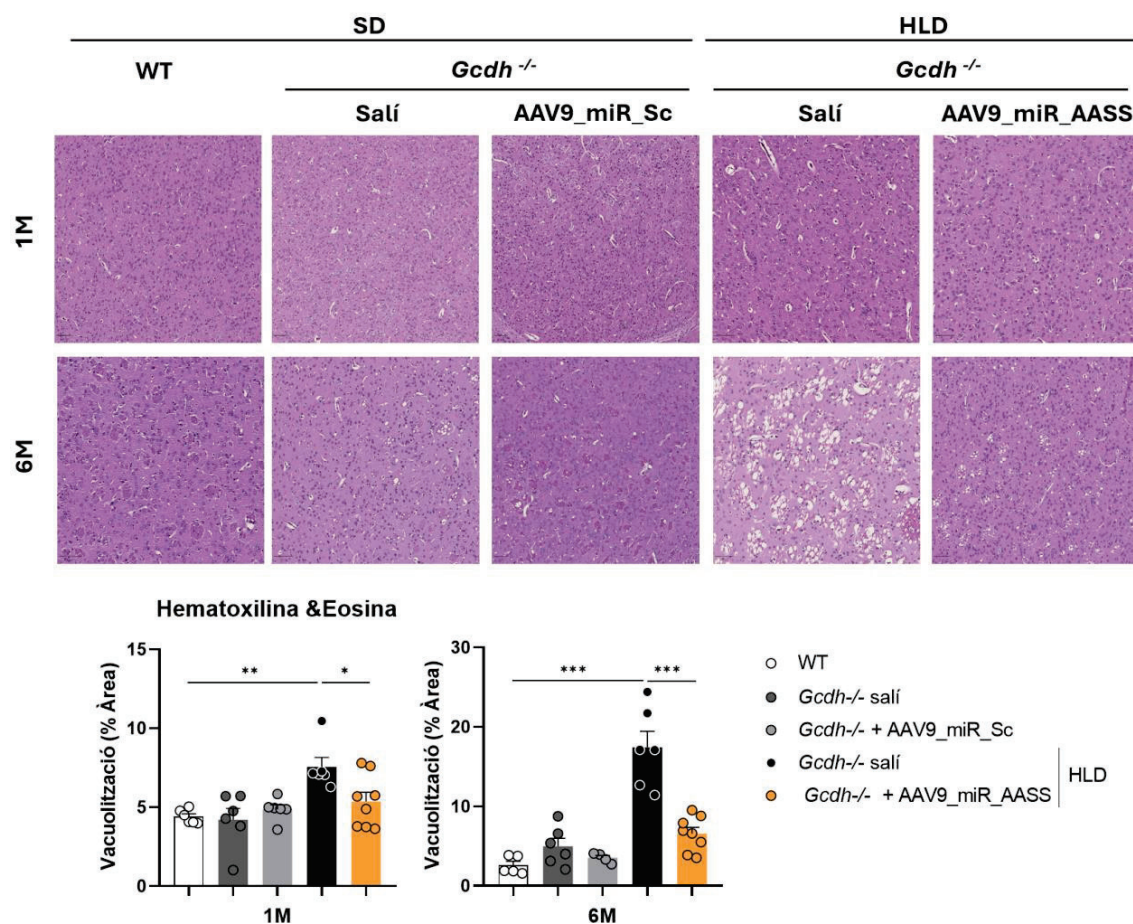


Figura 4.25. Anàlisi de la tinció d'Hematoxilina&Eosina del nucli estriat de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector control o amb l'AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament, totes les barres de mesura són de 100µm. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_Sc exposats a SD; i *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=3-5 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

La tinció amb Hematoxilina&Eosina (H&E) va permetre visualitzar la morfologia de la regió estriatal. Pel que fa als grups sotmesos a SD, no es van observar diferències significatives entre els ratolins *Gcdh*^{-/-} i WT, ni a curt ni a llarg termini. Per contra, els *Gcdh*^{-/-} exposats a ingesta de HLD van mostrar un augment significatiu en la presència de vacuoles en els dos temps experimentals. Cal destacar que la inducció del catabolisme de la lisina durant 5 mesos, va revelar una major formació de

vacuoles en els *Gcdh*^{-/-} en relació al mateix grup mantenint la HLD per poc temps, en un període de 4 dies, indicant que la severitat del fenotip neuropatològic era proporcional a la temporalitat de l'acumulació de metabòlits. El tractament amb l'AAV9_miR_AASS va mostrar una àrea de vacuolització significativament inferior al grup homòleg salí tant a 1 mes com a 6 mesos post-tractament (Figura 4.25). Aquests resultats van reiterar que el model de ratolí d'AG1 necessita ser exposat a HLD per recapitular el fenotip neuropatològic de la malaltia; i va ser en aquest context que l'AAV9_miR_AASS va mostrar un efecte terapèutic protegint la formació de vacuoles.

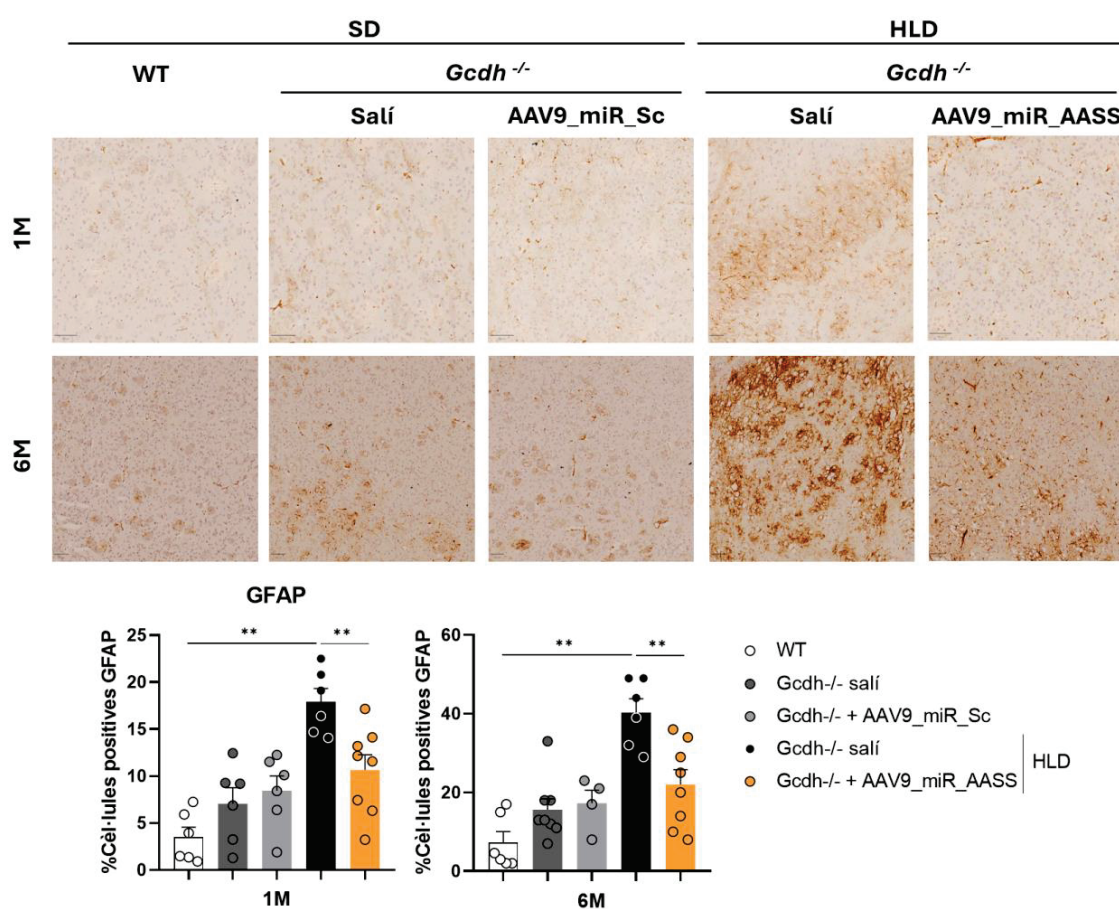


Figura 4.26. Anàlisis immunohistoquímiques de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) en el nucli estriat de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector control o el terapèutic AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament, totes les barres de mesura són de 100µm. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_Sc exposats a SD; i *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=3-5 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

L'anàlisi immunohistoquímica de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP), va permetre detectar astròcits reactius. En condicions de SD no es van observar

diferències significatives en la immunoreactivitat a GFAP, indicant absència en l'impacte neuropatològic en els grups *Gcdh*^{-/-} en els temps estudiats. Tanmateix, en la condició *Gcdh*^{-/-} exposada a HLD s'observaren signes d'astrogliosi tant als 4 dies com als cinc mesos de HLD, sent a llarg termini significativament superior que a curt termini. El marcatge d'astròcits reactius, es va detectar per un augment del diàmetre dels cossos cel·lulars i del gruix de les seves ramificacions, que sovint es trobaven agregades i situades majoritàriament al voltant de les vacuoles. En contraposició, en els animals *Gcdh*^{-/-} alimentats amb HLD i tractats amb el vector terapèutic, es va observar una reducció significativa del marcatge, suggerint que l'AAV9_miR_AASS previndria de l'astrogliosi fins als sis mesos post-tractament (Figura 4.26).

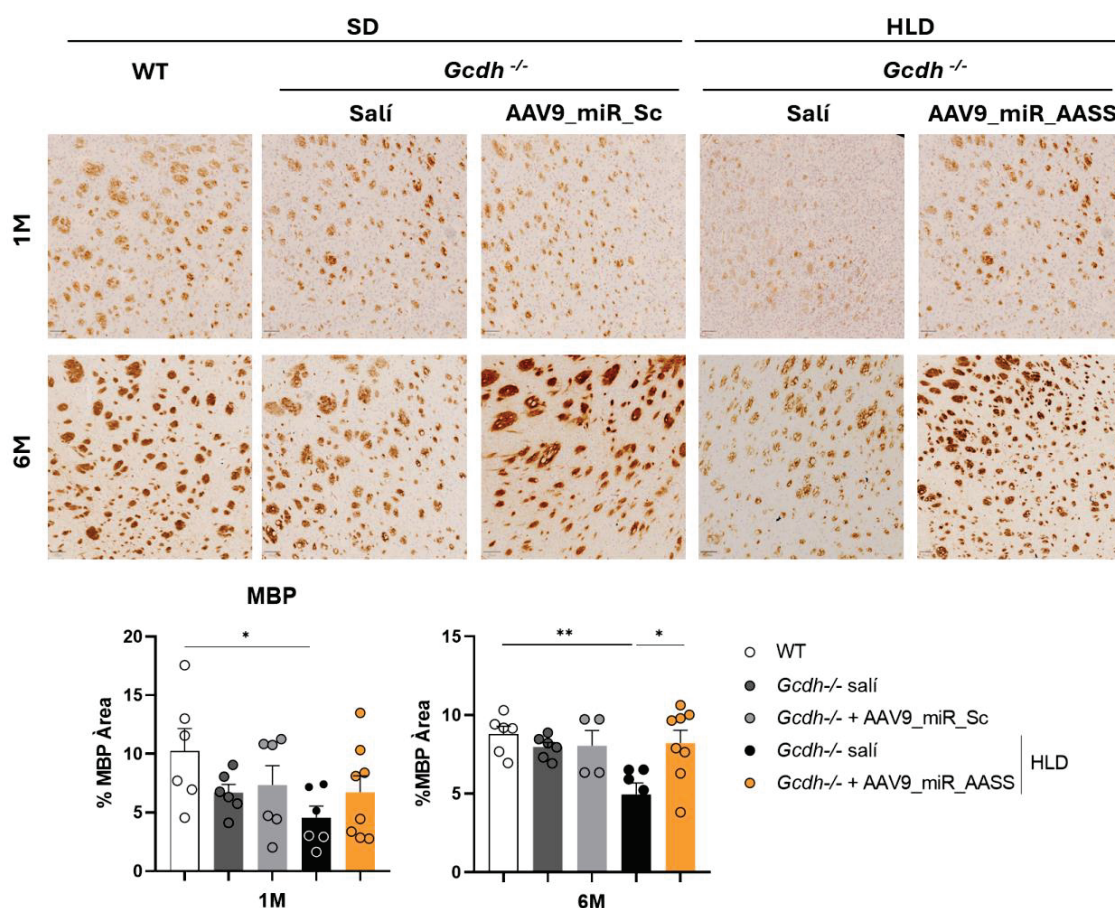


Figura 4.27. Anàlisis immunohistoquímiques de proteïna bàsica de mielina (MBP) en el nucli estriat de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector control o el terapèutic AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament, totes les barres de mesura són de 100µm. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_Sc exposats a SD; i *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=3-5 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

4.Resultats

A continuació, es va analitzar l'expressió de la proteïna bàsica de mielina (MBP), proteïna mitjançant immunodetecció. LA MBP forma part del procés de mielinització que recobreix els axons neuronals que conformen el sistema nerviós. Una vegada més, les condicions en SD no van mostrar diferències en el marcatge respecte a la condició WT. Mentre que la condició *Gcdh*^{-/-} HLD va presentar alteracions d'hipomielinització, observant que l'expressió de MBP era significativament inferior als grups exposats a SD amb absència de fenotip greu. L'administració del vector terapèutic a llarg termini, va mostrar valors de MBP similars als de condicions SD, indicant un efecte protector de la teràpia (Figura 4.27).

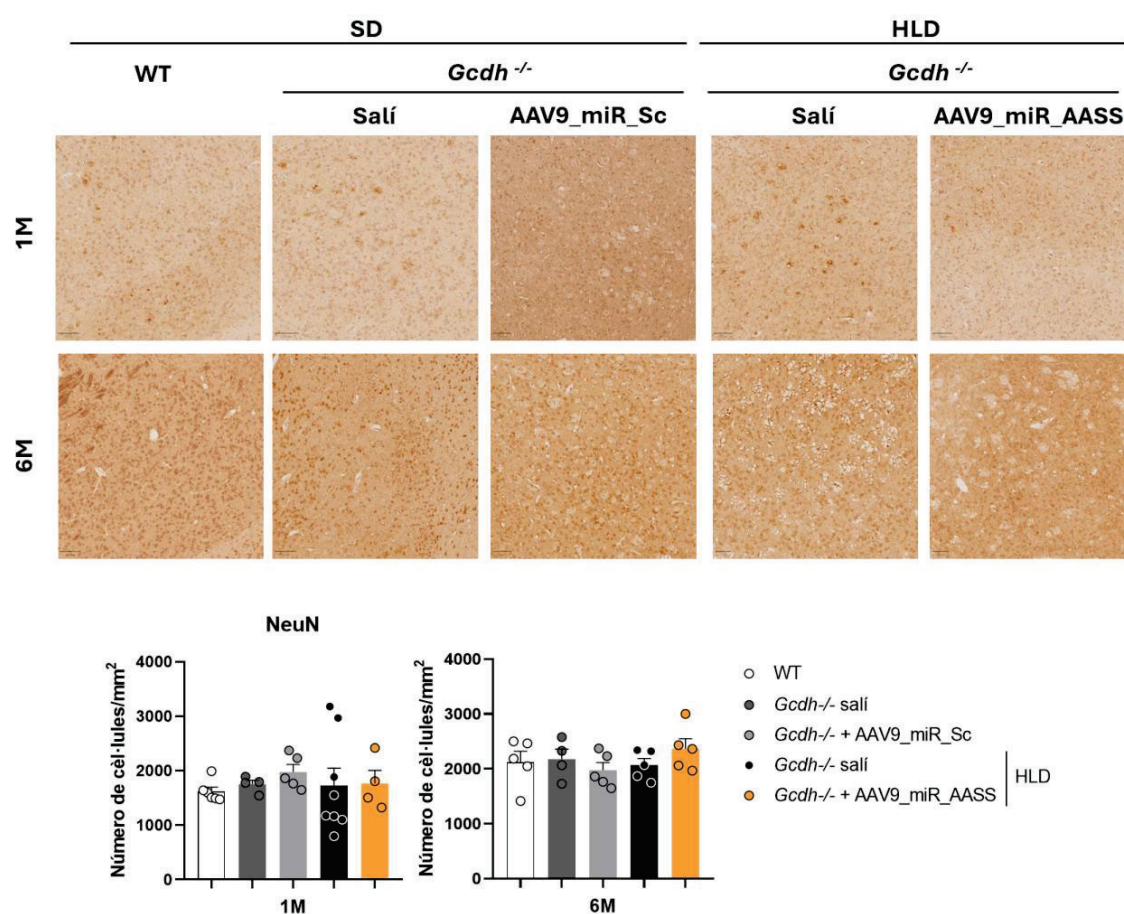


Figura 4.28. Anàlisi immunohistoquímiques de NeuN del nucli estriat de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector control o el terapèutic AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament, totes les barres de mesura són de 100µm. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_Sc exposats a SD; i *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=3-5 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

L'anàlisi immunohistoquímica del marcador neuronal (NeuN) detecta els nuclis neuronals. En aquesta anàlisi no es van observar diferències significatives de

densitat neuronal entre grups, ni tan sols en les condicions de fenotip sever de 5 mesos d'exposició a HLD (Figura 4.28). Aquests resultats suggerien, que en aquests temps, tot i l'alteració en astròcits i l'estat de mielinització, no hi hauria pèrdua neuronal en el nucli estriat. Tanmateix, no es poden descartar alteracions d'activitat neuronal, ja que aquesta tinció no permetia valorar una possible afectació en la funcionalitat neuronal.

En resum, les anàlisis dels efectes sobre les alteracions neuropatològiques van permetre aprofundir en la caracterització fenotípica del model AG1 en les condicions de fenotip greu. Es va detectar que en ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD, hi havia formació de vacuoles, activació d'astròcits reactius i pèrdua de mielina respecte als grups en SD. En canvi, ratolins *Gcdh*^{-/-} tractats amb l'AAV9_miR_AASS i exposats durant cinc mesos a HLD, van mostrar un estat de vacuolació, i marcatge de GFAP i MBP similar al de ratolins *Gcdh*^{-/-} en SD. Aquests fets suggerien que l'administració del vector terapèutic per via IV a P1, proporciona un efecte neuroprotector de la lesió estriatal induïda per HLD en ratolins *Gcdh*^{-/-}.

En paral·lel, els estudis amb el vector control AAV9_miR_Sc no van mostrar cap diferència o alteració d'aquesta condició respecte al grup *Gcdh*^{-/-} en SD, confirmant que a nivell neuropatològic l'administració IV a P1 de l'AAV9 no induiria toxicitat, ni aparentment cap efecte *off-target* no desitjat, el que reforçaria el potencial terapèutic de l'AAV9_miR_AASS.

4.3.4. Determinació dels efectes en l'estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu s'ha relacionat àmpliament amb malalties neurodegeneratives com el Parkinson o l'Alzheimer, i també s'ha descrit el seu rol en malalties metabòliques hereditàries (Kim et al., 2015; Ristoff et al., 2002). Tan en models animals com en pacients d'AG1 s'ha reportat que l'acumulació de metabòlits contribueix al dany neurològic, en part degut a una producció excessiva d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Els diferents paràmetres estudiats a la bibliografia mostren que en condicions d'acumulació de GA, es dona un desequilibri entre les defenses antioxidants i el dany oxidatiu, especialment a la zona estriatal, indicant que l'estrès oxidatiu podria estar implicat en la toxicitat dels metabòlits dicarboxílics acumulats

en el nucli estriat (Guerreiro et al. 2018; Latini et al. 2007; Seminotti et al. 2013, 2022; Wajner et al. 2019).

En aquest estudi, es va avaluar el dany oxidatiu en lípids i DNA en el nucli estriat de ratolins sotmesos a condicions de HLD, a curt i llarg termini. En paral·lel, es va estudiar la possible capacitat protectora de l'administració IV neonatal de l'AAV9_miR_AASS enfront aquests processos.

En primer lloc, es van analitzar els efectes sobre el dany oxidatiu en lípids, mitjançant la quantificació malondialdèhid (MDA) en homogenats d'estriat. El MDA es genera en situacions de peroxidació d'àcids grassos poliinsaturats, que es dona en contextos de lesió oxidativa de les membranes cel·lulars.

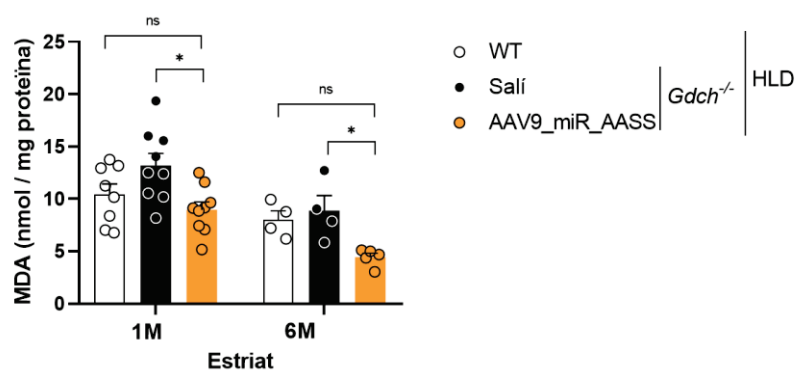


Figura 4.29. Anàlisi dels nivells de malondialdehid (MDA) en el nucli estriat de ratolins exposats a dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb l'AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=4-9 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

L'anàlisi de peroxidació lipídica en condicions de fenotip sever va revelar una tendència a la alça en els nivells de MDA del grup *Gcdh*^{-/-} salí respecte al grup WT, tant a curt com a llarg termini. Els *Gcdh*^{-/-} tractats amb el vector terapèutic van mostrar una disminució significativa en els nivells de MDA respecte als animals no tractats assolint valors similars als ratolins WT (Figura 4.29). Aquests resultats suggeririen que l'AAV9_miR_AASS previndria la inducció de l'augment de lesió oxidativa de les membranes lipídiques en contextos de HLD fins als sis mesos post-tractament.

Per tal d'aprofundir en al dany oxidatiu, es va estudiar l'impacte d'aquest a nivell de DNA, mitjançant el marcatge per immununohistoquímica de 8-oxo-2'-

desoxiguanosina (8-oxodG), una forma oxidada de la guanina. Les ROS generades en context d'acumulació dels metabòlits dicarboxílics, ataquen les bases nitrogenades que conformen el DNA, provocant estrès oxidatiu cel·lular.

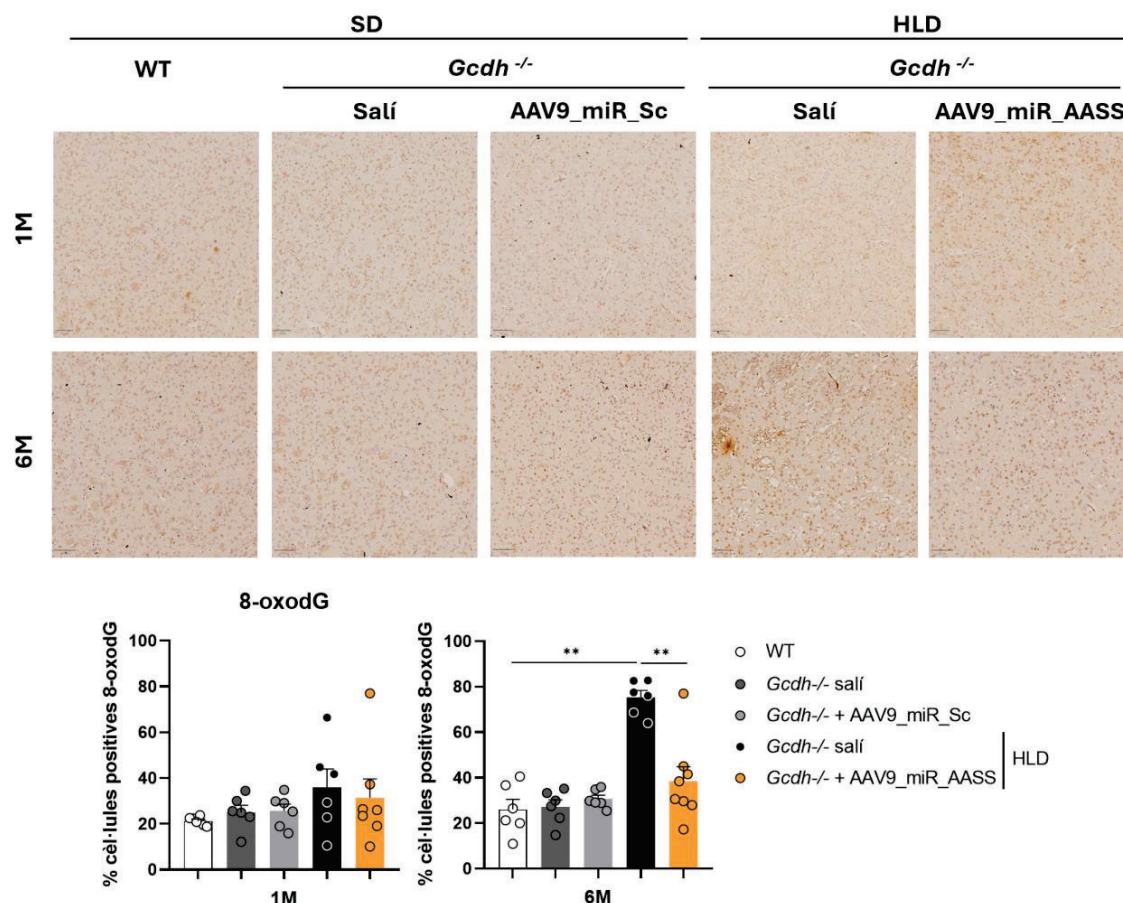


Figura 4.30. Anàlisi immunohistoquímiques de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) en la regió estriatal de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector control o el terapèutic AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament, totes les barres de mesura són de 100µm. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} no tractat i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_Sc exposats a SD; i *Gcdh*^{-/-} no tractat i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=3-5 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

A curt termini, al marcatge de 8-oxodG nuclear no presentava diferències significatives en la lesió oxidativa del DNA en els diferents grups. En canvi, als cinc mesos d'exposició a HLD, la condició *Gcdh*^{-/-} no tractada va revelar un augment significatiu del nivell de 8-oxodG respecte a les condicions en SD. A més, en la condició homòloga tractada amb el vector terapèutic es va mostrar un descens del nivell de marcatge, assimilant-se als valors dels grups a SD (Figura 4.30). Aquests resultats indicarien que l'administració IV neonatal de l'AAV9_miR_AASS exerciria

un efecte protector sobre el dany oxidatiu al DNA provocat per l'exposició continuada a HLD.

4.3.5. Estudi sobre les alteracions hepàtiques

Recentment, s'ha discutit el paper de la deficiència de GCDH en el teixit hepàtic, considerant que en altres trastorns derivats de defectes del catabolisme d'aminoàcids, els metabòlits tòxics originats en el fetge provoquen deficiències enzimàtiques al fetge i poden acumular-se al cervell (Manoli & Venditti, 2016). A més, és al fetge on la GCDH té una major abundància a nivell de RNA i proteïna. Tanmateix, tant en pacients d'AG1 com en estudis amb models de ratolí d'AG1, tot i les discrepàncies sobre com afecta el catabolisme de la lisina hepàtica al flux de metabòlits tòxics al cervell, no s'han descrit evidències clares de la presència d'alteracions hepàtiques degudes a la deficiència de GCDH (Barzi et al., 2023; Kölker et al., 2015; Sauer et al., 2006). No obstant això, tots els estudis previs en el model de ratolí d'AG1 s'han fet en condicions d'una exposició curta a HLD.

Per aprofundir sobre els possibles efectes sobre la funcionalitat hepàtica de la deficiència de GCDH, en condicions de sobreexposició o no a lisina i els possibles efectes terapèutics de l'AAV9_miR_AASS, es van explorar paràmetres bioquímics i morfològics hepàtics. Per altra banda, s'ha de tenir en compte que altes dosis de virus AAV poden provocar dany hepàtic (Hinderer et al., 2018; Jagadisan & Dhawan, 2023), així doncs, es va analitzar també possibles evidències d'efecte tòxic provocats per l'administració de l'AAV9_miR_AASS o l'AAV9_miR_Sc.

Pel que fa als paràmetres bioquímics hepàtics, es va analitzar l'activitat de la fosfatasa alcalina (ALP, per les seves sigles en anglès), els nivells de colesterol, proteïna total i triglicèrids en sèrum de ratolins.

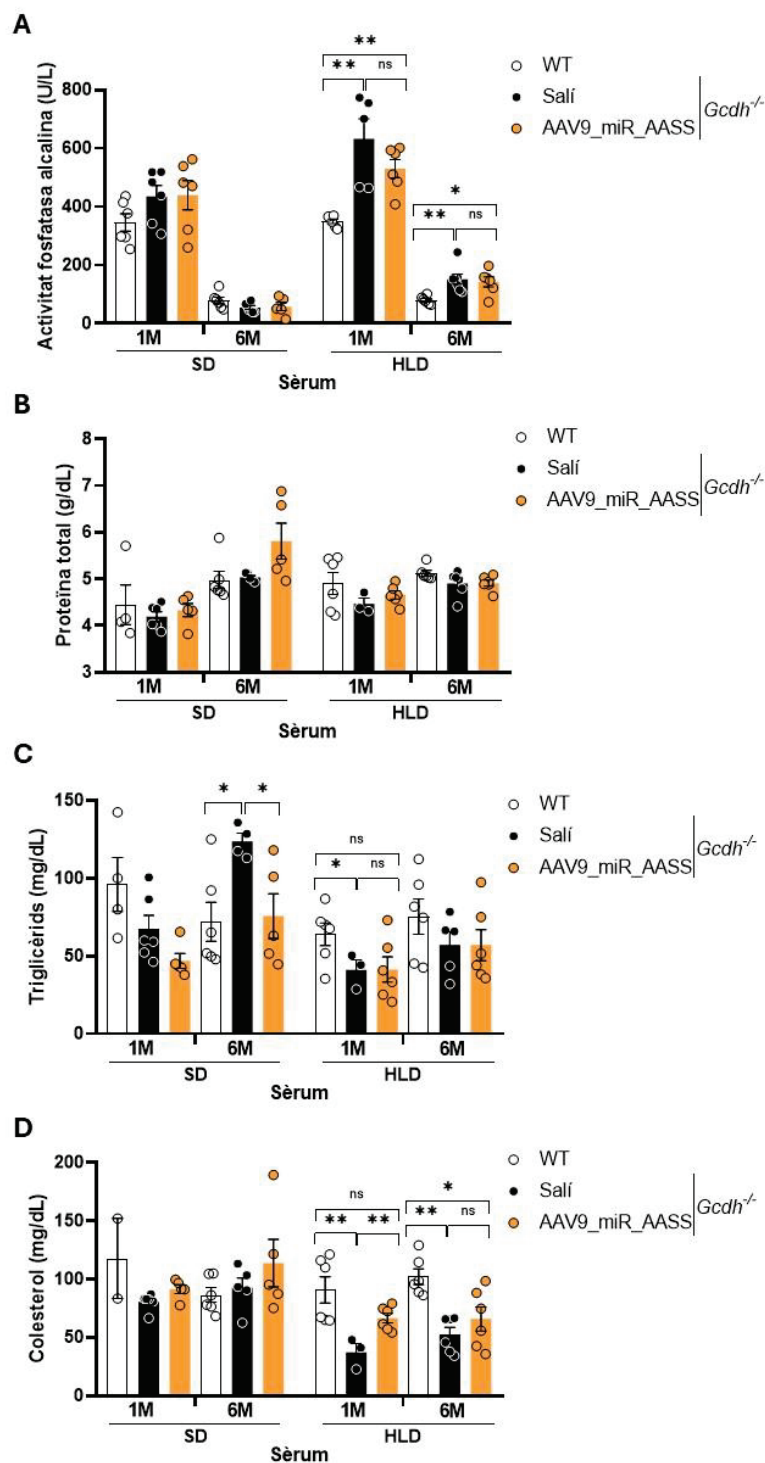


Figura 4.31: Anàlisi dels paràmetres bioquímics hepàtics en sèrum de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector terapèutic AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament. Quantificació de l'activitat fosfatasa alcalina i contingut de colesterol, proteïna total i triglicèrids. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí, *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a SD o HLD. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01.

La ALP és una proteïna enzimàtica situada a la membrana cel·lular dels hepatòcits, actua catalitzant la hidròlisi dels èsters de fosfat orgànic presents a l'espai extracel·lular. Més del 80% de les ALP circulants en sèrum provenen del fetge i dels ossos. Així doncs, nivells anòmalament elevats de la seva activitat en sèrum es relacionen amb la presència de dany hepàtic o bé d'un trastorn ossi (Makris et al., 2023). Les anàlisis de les mostres obtingudes a un mes d'edat, van mostrar que en condicions de SD no hi havia diferències significatives entre els animals WT i *Gcdh*^{-/-}. Per contra, els grups *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD, tant els que havien rebut el vector terapèutic com els que no, van revelar un augment de l'activitat ALP respecte a la condició WT, suggerint la presència de dany hepàtic en aquests ratolins. Tanmateix, els nivells de l'activitat ALP del grup tractat eren lleugerament inferiors als del salí, indicant una tendència en la prevenció de l'alteració hepàtica per part del vector terapèutic. Seguint la mateixa línia, la condició tractada amb l'AAV9_miR_AASS i exposada durant 5 mesos a HLD va mostrar valors similars als de la condició homòloga salina, en aquest cas no hi havia indicis de recuperació en els nivells d'activitat ALP, probablement degut a la llarga temporalitat d'exposició al fenotip sever. Finalment, cal destacar que tant als grups exposats a SD com HLD, es va observar un descens de l'activitat ALP en els animals de 6 mesos d'edat respecte als d'un mes (Figura 4.31A).

Els nivells proteïna total, triglicèrids i colesterol també són indicadors de l'estat hepàtic, ja que el fetge és l'òrgan central de la seva síntesi; així doncs alteracions en la funció hepàtica afecten directament a la concentració en sèrum d'aquests compostos. No obstant això, la producció d'aquests compostos impliquen diferents ubicacions i maquinària cel·lular. Mentre que les proteïnes són sintetitzades a partir d'aminoàcids per part del ribosoma i l'aparell de golgi, el colesterol i triglicèrids es sintetitzen *de novo* a partir dels seus precursors, l'acetil-CoA i els àcids grassos respectivament, i la seva producció ve regulada per senyals metabòliques i hormonals. Pel que fa als nivells de proteïna total, no es van observar diferències significatives ni tendències clares entre els diferents grups a les diferents condicions, indicant que en el model de ratolí d'AG1, tot i estar sota condicions de fenotip sever, el fetge manté la capacitat de sintetitzar proteïnes de forma adequada (Figura 4.31B).

Els valors de triglicèrids es trobaven augmentats en els ratolins *Gcdh*^{-/-} respecte als WT als 6 mesos d'edat en condicions de SD, fet que indicaria una alteració en el metabolisme dels àcids grassos. En canvi, els nivells de la condició tractada amb l'AAV9_miR_AASS van revertir aquest augment i s'assimilaven als valors dels WT, suggerint que el vector terapèutic seria capaç de prevenir l'alteració crònica observada (Figura 4.31C). En condicions de HLD, les anàlisi de triglicèrids així com les de colesterol en sèrum van mostrar un comportament similar. Es va observar una disminució en els nivells de triglicèrids i colesterol en els ratolins *Gcdh*^{-/-} respecte al grup WT, suggerint una alteració en la funció dels hepatòcits implicada en la síntesi o renovació d'aquests components en condicions de HLD. El tractament amb el vector terapèutic va prevenir la caiguda del contingut de colesterol, de forma significativa a 1 mes post-tractament i es va observar la mateixa tendència als 6 mesos. En el cas dels triglicèrids no es va detectar cap efecte de millora per la teràpia en les condicions de HLD. (Figura 4.31C,D). Aquests resultats indicarien que en condicions de HLD hi hauria alteracions específiques en les vies del metabolisme lipídic i d'àcids grassos dels hepatòcits, que el vector terapèutic podria prevenir parcialment.

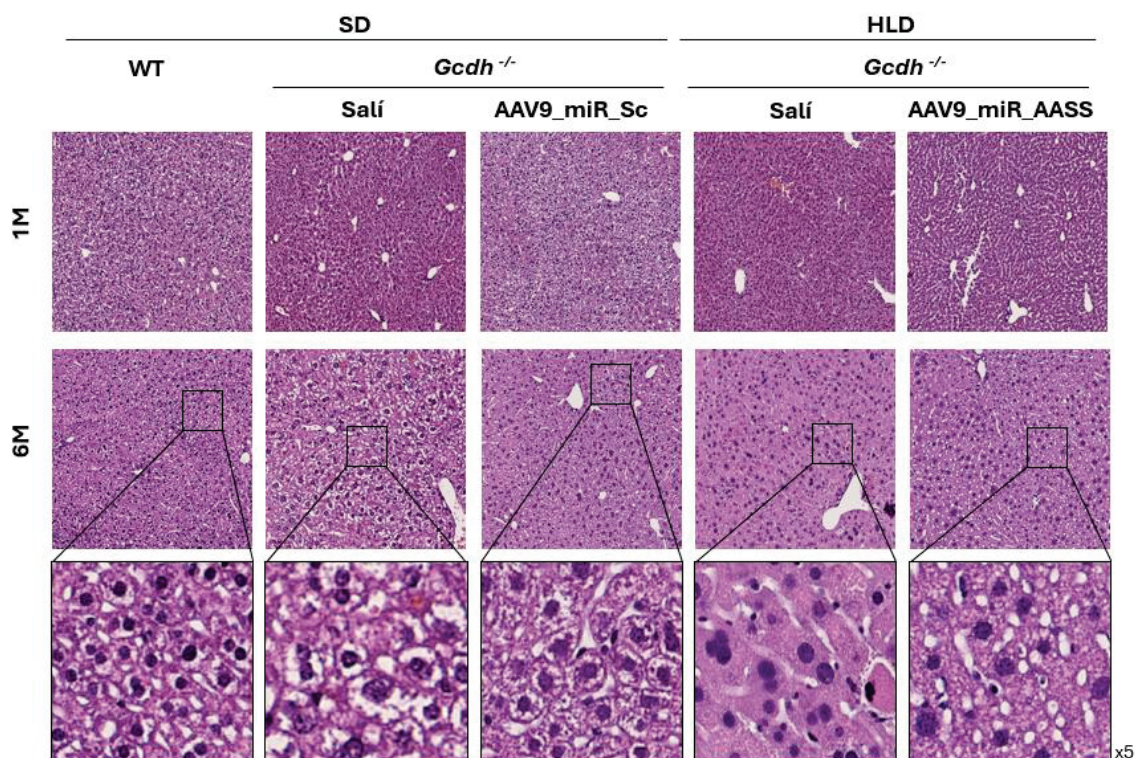


Figura 4.32. Anàlisi de la tinció d'Hematoxilina&Eosina del fetge de ratolins exposats a dieta estàndard (SD) o dieta alta en lisina (HLD) i tractats o no amb el vector control o el terapèutic AAV9_miR_AASS. Les anàlisis es van realitzar a un i sis mesos després del tractament, totes les barres de mesura són de 50µm. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} no tractat i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_Sc exposats a SD; i *Gcdh*^{-/-} no tractat i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja ±SEM, n=3-5 animals per grup.

L' anàlisi histològica per tinció amb Hematoxilina&Eosina (H&E) va permetre visualitzar la morfologia hepàtica. A un mes d'edat, no es van observar alteracions significatives entre les diferents condicions exposades a SD i HLD, segurament, degut a que aquest és una etapa molt primerenca per poder detectar alteracions morfològiques. En canvi, als sis mesos d'edat, el grup *Gcdh*^{-/-} SD va mostrar alteracions morfològiques respecte als ratolins WT, incloent signes de vacuolització citoplasmàtica d'hepatòcits, invaginació citoplasmàtica intranuclear i microgranulomes abundants. Pel que fa als grups exposats al llarg de cinc mesos a HLD, la condició *Gcdh*^{-/-} va mostrar una alteració generalitzada amb anisocariosi, hepatòcits amb múltiples nuclis, apoptosi hepatocel·lular i infiltrats de cèl·lules mononuclears (periportal i perivascular). El grup homòleg tractat a període neonatal, també va mostrar alteracions morfològiques hepàtiques però menys pronunciades en comparació amb el grup *Gcdh*^{-/-} HLD, mostrant una millora del fenotip hepàtic sever per part de l'acció terapèutica de l'AAV9_miR_AASS. Al llarg dels sis mesos, el grup *Gcdh*^{-/-} tractat amb el vector control, AAV9_miR_Sc, presentava una morfologia hepàtica similar al grup *Gcdh*^{-/-} que no havia rebut el vector, indicant que la transducció al fetge de l'AAV9 no generava cap efecte advers addicional de toxicitat hepàtica (Figura 4.32).

En conjunt, l'exploració hepàtica va permetre aprofundir en la caracterització del model ratolí d'AG1. Es va detectar que en el model *Gcdh*^{-/-} l'exposició a HLD induïx alteracions de funcionalitat hepàtica, relacionades amb l'augment de l'activitat ALP i la reducció de la síntesi de components lipídics, com són el colesterol i triglicèrids. Això, correlacionaria amb l'observació d'alteracions morfològiques en hepatòcits als cinc mesos d'exposició a HLD. Tot i que, les alteracions en els paràmetres bioquímics en molts casos ja es detectaven al mes de vida, a nivell morfològic el dany hepàtic no es va observar fins als sis mesos d'edat, probablement degut a que les lesions morfològiques es manifesten com a resultat d'alteracions metabòliques perllongades en el temps. Aquests resultats posen de manifest la necessitat d'un

estudi més detallat que permeti aprofundir sobre l'evolució de l'estat del fetge amb l'edat i l'exposició a HLD en els ratolins *Gcdh*^{-/-}. A destacar que, tant a nivell bioquímic com morfològic, el tractament per via IV neonatal amb l'AAV9_miR_AASS resultava en una millora parcial del fenotip hepàtic, indicant certa capacitat protectora del vector terapèutic.

4.3.6. Evolució del pes corporal i supervivència

En estudis previs a la bibliografia s'ha descrit la severitat de l'impacte de HLD en models de rata i ratolí AG1 en l'aparició dels símptomes clínics. Aquests es caracteritzen per una activitat espontània i hipotèrmia, i una reducció de la ingesta d'aliments fins a la pèrdua de pes, compromentent fins al 50% la supervivència durant les primeres 96 hores post-deslletament (Gonzalez Melo et al., 2021; Sauer et al., 2015; Zinnanti et al., 2006).

Per tal d'ampliar la caracterització de la nostra cohort i estudiar-ne l'efecte de l'AAV9_miR_AASS, es va realitzar un seguiment del pes corporal des del deslletament i exposició a HLD, fins al moment de la mort natural o de l'eutanàsia dels grups experimentals. De la mateixa manera, es va dur a terme una monitorització de la supervivència dels grups *Gcdh*^{-/-} salins i *Gcdh*^{-/-} tractats amb el vector terapèutic.

L'estudi del seguiment de pes corporal va evidenciar que l'impacte de HLD en ratolins *Gcdh*^{-/-} provocava una pèrdua de pes del 15% als tres dies d'ingesta de HLD. En aquest mateix grup, tot i revertir-se la disminució de pes inicial, la tendència de l'evolució es va mantenir significativament per sota del pes corporal mitjà del grup WT al llarg de tot el període de seguiment. Pel que fa la condició post-tractament amb l'AAV9_miR_AASS, es va observar que l'evolució del pes es comportava similar al grup WT fins al dia 75 d'exposició a HLD. A partir d'aquest punt, l'evolució de pes del grup *Gcdh*^{-/-} tractat amb el vector terapèutic es va mantenir a una fase de *plateau*, mentre que el grup WT va seguir augmentant de pes fins a arribar a valors significativament superiors. Al comparar els grups *Gcdh*^{-/-} tractats i no tractats amb l'AAV9_miR_AASS, es va observar que les corbes de guany de pes es comportaven significativament diferent fins al dia 15 post-HLD, indicant que l'AAV9_miR_AASS

protegiria els ratolins *Gcdh*^{-/-} de la pèrdua de pes durant el primer període d'exposició a HLD (Figura 4.33A).

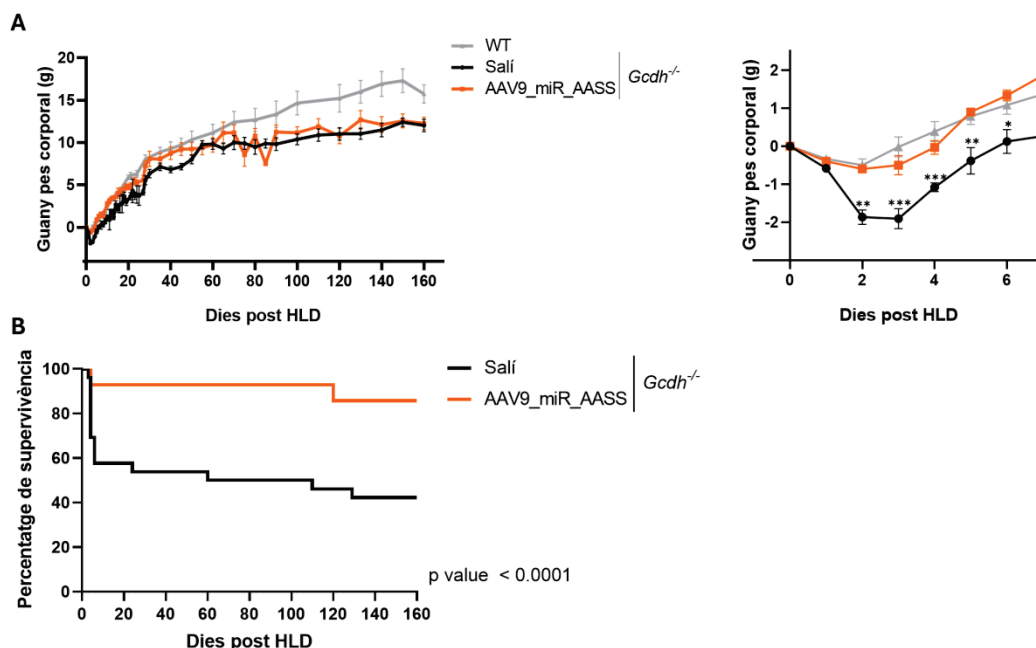


Figura 4.33. Anàlisi de l'evolució del pes corporal i de la supervivència de ratolins exposats a dieta alta de lisina (HLD) i tractats o no amb el vector terapèutic AAV9_miR_AASS. A) Evolució del guany del pes corporal. Els valors es van recollir des del deslletament fins al sis mesos després del tractament. Grups experimentals: *wild-type* (WT), *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD. Els resultats s'expressen com la mitja $\pm$ SEM, n=6-15 animals per grup. La significança es va avaluar mitjançant el test de Mann-Whitney de dues cues: * p<0.05, ** p<0.01. *** p<0.001. B) Percentatge de la supervivència. Els valors es van recollir des del deslletament fins al sis mesos després del tractament. Grups experimentals: *Gcdh*^{-/-} salí i *Gcdh*^{-/-} AAV9_miR_AASS exposats a HLD, n= 15-25 animals per grup. L'anàlisi es va realitzar mitjançant el mètode Kaplan-Meier i es va avaluar la significança amb el test de rang llarg (Mantel-Cox).

El seguiment de la supervivència dels ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD, va demostrar que aquesta té un impacte notable en la supervivència dels animals. En la condició d'animals que no havien rebut el vector terapèutic, la supervivència va disminuir fins a un 60% durant els primers dies d'exposició a HLD, arribant a ser del 50% al cap de cinc mesos en HLD. Cal remarcar que, la condició tractada per via IV a P1 amb l'AAV9_miR_AASS va millorar la supervivència fins al 87% després de cinc mesos d'alimentació continuada i sostinguda amb HLD (Figura 4.33B).

En conjunt, aquests resultats posen de manifest que la inhibició del catabolisme de la lisina mitjançant l'estratègia de iRNA de l'AAV9_miR_AASS administrat en edats primerenques del desenvolupament, proporciona un benefici terapèutic en el model ratolí de l'AG1.

5.DISCUSSIÓ

L'acidúria glutàrica tipus 1 (AG1) és una malaltia metabòlica hereditària (MMH) causada per la deficiència enzimàtica de la glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH), un enzim implicat en el catabolisme de la lisina, el triptòfan i la hidroxilisina. Amb la deficiència de GCDH no es realitza adequadament la conversió de glutaril-CoA a crotonil-CoA, donant lloc a l'acumulació de l'àcid glutàric (GA) i el 3-hidroxiglutaric (3-OHGA) en els fluids i teixits corporals. Aquests intermediaris s'acumulen principalment al sistema nerviós central (SNC), a causa de la manca de transportadors cerebrovasculars específics i la baixa permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (BHE). L'augment de la concentració d'aquests metabòlits neurotòxics desencadena les característiques clíniques de l'AG1, caracteritzades per crisis encefalopàtiques agudes (CEA) que condueixen a una lesió estriatal bilateral permanent que es manifesta clínicament amb distonia i trastorns complexos del moviment entre altres símptomes (Harting et al., 2009; Hedlund et al., 2006; Jafari et al., 2011).

Actualment, l'AG1 es diagnostica mitjançant el Programa de Cribratge Neonatal (PCN) en molts països, el que permet un tractament precoç per tal d'evitar el dany neurològic. Aquest tractament es basa en una disminució del catabolisme mitjançant una dieta restrictiva en lisina i triptòfan, i es suplementa amb carnitina per tal de desintoxicar l'acumulació de glutaril-CoA formant la glutarilcarnitina (C5DC). En cas de situacions de risc, com infeccions, cirurgies, etc., es prevé el catabolisme amb l'administració elevada d'hidrats de carboni i la restricció de proteïnes naturals durant 24-48h (Boy et al., 2023). Tot i que aquest tractament metabòlic es considera segur i eficaç, un terç dels pacients encara experimenten dany estriatal malgrat el diagnòstic i el tractament precoç, especialment si no es segueixen estrictament les directrius dietètiques (Boy et al., 2021a; Kölker et al., 2007). L'esperança de vida dels individus afectats no detectats pel PCN varia significativament, mentre que un 50% arriben a l'edat adulta, un 10% dels infants afectes no diagnosticats no sobreviuen a la seva primera dècada de vida a causa d'un episodi agut (Kyllerman et al., 2004). Per tant, en el context actual, es requereixen estratègies terapèutiques més eficaces per l'AG1.

Les teràpies de reducció de substrat s'han plantejat com a potencials aproximacions terapèutiques per als trastorns innats del metabolisme. Aquestes intervencions

actuen disminuint els nivells de metabòlits tòxics, mitjançant la inhibició d'un enzim previ en la mateixa via metabòlica de l'enzim deficient. Concretament, la inhibició de l'enzim 2-aminoadípíic semialdehid sintasa (AASS) codificat pel gen *AASS* primer enzim de la via del catabolisme de la lisina, s'ha considerat com una diana terapèutica pel tractament de l'AG1. S'ha demostrat que ratolins *Gcdh*^{-/-}/*Aass*^{-/-} mostren una disminució en la concentració de metabòlits acumulats en orina, fetge i cervell (Barzi et al., 2023; Leandro et al., 2020). Cal destacar, que la deficiència d'AASS condueix a la hiperlisinèmia, un trastorn enzimàtic considerat una entitat benigna, és a dir sense conseqüències clíniques aparents, per tant, inhibir aquest enzim específic seria segur en humans (Leandro & Houten, 2020). Així doncs, el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser el desenvolupament d'una teràpia gènica per al tractament de l'AG1 basada en el silenciament mitjançant l'administració d'un vector viral adenoassociat (AAV) amb un constructe de RNA d'interferència (iRNA) per tal de silenciar l'expressió de l'AASS. En conjunt, la inhibició d'aquest primer enzim del catabolisme de la lisina, evitaria la degradació de la lisina, i conseqüentment, reduiria l'acumulació del substrat de la GCDH i evitaria l'acumulació de metabòlits neurotòxics responsables de la cascada fisiopatològica que caracteritza l'AG1.

5.1. Disseny de la teràpia gènica

L'estratègia seleccionada per silenciar l'expressió de l'AASS va ser a través del mecanisme de iRNA, concretament mitjançant la introducció exògena d'un microRNA artificial (miRNA) dirigit al transcrit de l'AASS. Es va seleccionar aquesta estratègia de silenciament genètic d'entre d'altres, com ho són els oligonucleòtids antisentit (ASO), les seqüències petites d'interferència d'ARN (siRNA), les seqüències de forqueta curta d'ARN (shRNA) per l'efecte potent i perllongat, i la seguretat que se n'ha descrit. Per una banda, les estratègies de shRNA i miRNA, a diferència dels ASO i siRNA, s'introdueixen mitjançant vectors d'expressió sota una seqüència promotora que permet la generació de múltiples molècules efectores, aquest fet permet que d'una única dosi se'n puguin expressar les seqüències inhibidores de manera estable i perllongada en el temps (Lam et al., 2015). Per altra banda, els miRNA s'expressen sota promotors pol II, fet que permet modular-ne l'expressió i dirigir-la cap als teixits diana, per contra els shRNA ho fan sota promotors pol III (Maczuga et al., 2012; Pfister et al., 2017). S'han descrit casos de toxicitat severa després de l'administració de dosis elevades de vectors que codifiquen shRNA sota sistemes d'expressió de pol III, degut a que l'expressió ve regulada per promotors que no permeten modular la intensitat i la direcció d'expressió del transgèn (Borel et al., 2011; Grimm et al., 2006). McBride i col·laboradors han estudiat ampliament l'ús dels miRNA com a alternativa dels shRNA, ja que s'ha reportat un efecte de neurotoxicitat associada a la sobreexpressió del shRNA en models de ratolins, probablement a causa de la saturació de l'ús del mecanisme endogen del iRNA. En canvi, els resultats dels estudis en ratolins i primats no humans utilitzant les mateixes seqüències inhibidores però en una estructura de miRNA han mostrat una major eficiència de silenciament i absència de toxicitat, indicant que els miRNA presenten una major seguretat respecte a l'ús dels shRNA i sense comprometre'n l'eficàcia de silenciament (McBride et al., 2008, 2011). Actualment, hi ha diversos estudis pre-clínic i assajos clínics de teràpies de supressió gènica basada en miRNAs per a malalties neurodegeneratives com la malaltia de Huntington o l'atàxia espinocerebel·losa entre d'altres (Keiser et al., 2016; Traber & Yu, 2023).

En aquest treball s'ha abordat el disseny d'un transgèn terapèutic basat en un miRNA artificial amb capacitat d'induir el silenciament del transcrit de l'AASS. Es van generar quatre seqüències pri_miRNA d'estudi, les quals es van dissenyar seguint premisses ja descrites a la bibliografia, considerant maximitzar l'eficiència de silenciament i reduir els possibles efectes en altres gens no diana (*off-target*) (Bofill-De Ros & Gu, 2016; Cabrera & Mueller, 2016). Es van dissenyar seqüències que reconeguessin el cDNA de l'AASS humà i l'Aass de ratolí, ja que l'estratègia terapèutica proposada s'avaluava en un model murí, però l'objectiu a llarg termini és la translació clínica de la teràpia. Per maximitzar l'expressió dels miRNA, les seqüències pri_miR_AASS es van flanquejar per l'estructura del pri_miR_16 humà endògen, ja que s'ha descrit que el seu context genòmic és altament funcional per induir el silenciament genètic (Watanabe et al., 2016). Aquestes seqüències són les seqüències primàries que mitjançant el mecanisme endogen de iRNA donaran lloc al miRNA madur. Per regular l'expressió de les seqüències pri_miR_AASS, es va seleccionar el promotor CAG, el qual proporciona una expressió potent i ubíqua, i permet l'expressió del transgèn terapèutic en qualsevol tipus cel·lular del SNC (Thirumara Rajamani et al., 2021).

La funcionalitat de l'estratègia de silenciament genètic basada en miRNA, s'ha demostrat en un primer bloc experimental *in vitro*. De les 4 seqüències de pri_miR_AASS dissenyades es va observar que les seqüències miR_3 i miR_4, eren les que oferien una major eficiència de silenciament del cDNA de l'AASS. Aquestes dues seqüències van demostrar una capacitat de silenciament tant en material biològic provinent de ratolins com d'humans. Tenint en compte que en estudis en el camp s'ha considerat que un silenciament *in vitro* moderat és aquell que redueix l'activitat RLuc/FLuc al 50%, i un de potent fins al 80% (Martier et al., 2019), es va concloure que el miR_4 era el miRNA més eficient mostrant un 60% i 75% de reducció de l'expressió de la proteïna AASS en humà i ratolí respectivament. En paral·lel, es va comprovar que l'anàlisi del miR_4-*Scrambled*, que conté els mateixos nucleòtids que pri-miR_4 però de forma desordenada no provocava silenciament, i es va confirmar que la capacitat de supressió gènica del transgèn terapèutic venia donada única i específicament per la seqüència miR_4.

Els vectors derivats del virus adenoassociat (AAV) son atractius en teràpia gènica ja que es tracten de virus no replicatius que es mantenen en el nucli de forma episomal i garanteixen l'expressió a llarg termini en cèl·lules terminalment diferenciades (Hanaford et al., 2022). A més, els AAV no estan associats a cap patologia rellevant en humans. S'han descrit diversos serotips amb tropisme per a diferents teixits, els quals presenten un excel·lent perfil de seguretat i una immunogenicitat relativament baixa (C. Li & Samulski, 2020). L'eficàcia de la teràpia gènica al SNC utilitzant aquests vectors s'està utilitzant per tractar nombroses malalties com la malaltia de Parkinson (Eberling et al., 2008; Mittermeyer et al., 2012), la malaltia de Baten (Katz et al., 2015) i l'atrofia muscular espinal (Mendell et al., 2017), entre d'altres. En el context d'aquest treball es va seleccionar l'AAV9, un serotip amb tropisme cap al cervell i capacitat per creuar la BHE, ja que AG1 presenta alteracions neurològiques importants i es pretenia que la teràpia fos eficaç a SNC (Dufour & McBride, 2016). Per altra banda, també es va treballar amb un AAV de serotip 9 modificat (AAV9_p31), el qual s'ha descrit que en ratolins augmenta l'eficàcia de lliurament genètic al SNC respecte a l'AAV9. Concretament, la modificació incorporada en la càpsida del serotip permet la transducció a la BHE a través del receptor de l'anhidrasa carbònica IV (Zhang et al., 2024). Recentment, s'ha destacat l'AAV9_p31 per la seva utilitat per realitzar investigació bàsica en models de ratolins i amb l'objectiu d'avaluar les teràpies dirigides al SNC (Bunuales et al., 2024). Així es van fer els dissenys pertinents amb cada un d'aquests vectors AAV9 amb el pri-miR_4 seleccionat (miR_AASS) (Figura 5.1).

Mecanisme Acidúria glutàrica tipus 1

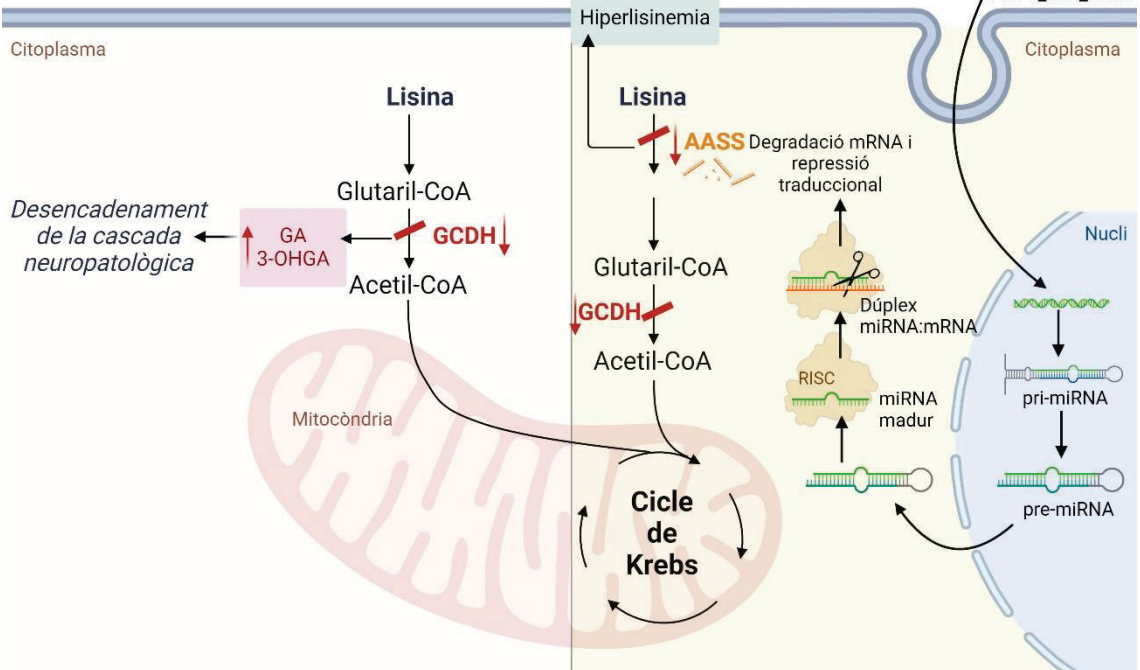


Figura 5.1. Representació esquemàtica dels mecanismes de l'AG1 i el mecanisme d'acció de l'AAV9_miR_AASS. Mecanisme de l'AG1: la deficiència enzimàtica de la glutaril-CoA deshidrogenasa (GCDH) provoca la generació d'àcid glutàric (GA) i l'àcid 3-hidroxiglutaric (3-OHGA), que actuen com a neurotoxines endògenes. Mecanisme d'acció de l'AAV9_miR_AASS: el vector terapèutic codifica per a una seqüència pri_miRNA que dona lloc a un miRNA madur dirigit al mRNA de l'alfa-aminoadipic semialdehid sintasa (AASS). La degradació del transcrit de l'AASS actua com a estratègia terapèutica de reducció de substrat per a l'AG1, prevenint l'acumulació de metabòlits tòxics i donant lloc a una hiperlisinèmia benigna.

5.2. Transducció i eficiència de silenciament als teixits diana

L'eficiència de la transducció dels vectors pot variar segons quina sigui la via d'administració i el període de desenvolupament post-natal en que es dona l'administració de l'AAV (Castle et al., 2016). Tenint en compte aquestes evidències, es va explorar l'administració de l'AAV9_miR_AASS terapèutic a diferents etapes del desenvolupament del ratolí: en ratolins d'edat jove-adulta (P30), en edat jove (P15) i en edat neonatal a un dia de vida (P1). A més, per tal d'optimitzar la transducció tant als teixits perifèrics com al SNC, es va treballar amb les vies d'administració intravenosa (IV) a nivell sistèmic, i via cisterna magna (CM) de manera locoregional, permetent l'administració directa al líquid cefaloraquídi (CSF). Cal destacar que en el cas de les dues vies, ja s'havia reportat prèviament l'eficiència de transducció de l'AAV9 en estudis *in vivo* en animals rosegadors i primats no humans (Chandran et al. 2023; Hinderer et al. 2014a; b; Marchi et al. 2022).

L'avaluació de la biodistribució i de l'eficiència de silenciament de les diferents estratègies d'administració es va realitzar estudiant tres paràmetres corresponents a tres estadis diferents de l'efecte del vector terapèutic. En primer lloc, la quantificació del miR_AASS madur com a mesura de la capacitat de transducció del vector i de generació de la molècula efectora del silenciament, mitjançant una anàlisi dissenyada específicament per quantificar la presència de la seqüència monocatenària de miRNA en els teixits determinats. En segon lloc, l'anàlisi de l'expressió de la proteïna AASS, sent indicador de la regulació post-transcripcional del vector terapèutic. I per últim, la quantificació dels marcadors bioquímics de la malaltia, el GA i el 3-OHGA, els quals s'han considerat paràmetres d'estudi per a l'avaluació de l'eficàcia de possibles teràpies per a l'AG1 (Barzi et al., 2023; Guo et al., 2022b; Koeller et al., 2002; Mateu-Bosch et al., 2024b). Les diverses anàlisis es van realitzar en sèrum, fetge i estriat dels ratolins. La regió estriatal és reconeguda com a principal regió cerebral afectada en l'AG1, ja que s'ha demostrat que la manca de transportadors cerebrovasculars i la baixa permeabilitat de la BHE provoquen un flux limitat dels metabòlits neurotòxics i l'acumulació perllongada d'aquests a l'estriat (Jafari et al., 2011; Sauer et al., 2006). Pel que fa al fetge, tot i no haver-hi descripcions a la bibliografia d'afectació hepàtica en l'AG1, és l'òrgan amb més

abundància de GCDH, i on es dona una part important del catabolisme de la lisina, per tant, es considera un teixit d'interès on es dona acumulació de metabòlits prèviament a la seva alliberació a la circulació (Matthews, 2020). A més, recentment s'ha descrit que en l'AG1 la correcció de la funció metabòlica en fetge podria contribuir positivament a reduir la simptomatologia de la patologia (Barzi et al. 2023; Houten & Coughlin 2023).

L'administració del vector AAV9_miR_AASS en edat neonatal (P1), jove (P15) i jove-adulta (P30), va donar lloc a una transducció exitosa al fetge de ratolins un mes després de la injecció. Tanmateix, únicament l'administració intravenosa neonatal mostrava una òptima biodistribució i eficiència de silenciament de l'AASS en estriat, suggerint que l'AAV9 administrat en edats avançades no mostrava un bon tropisme cap al cervell. Una de les principals hipòtesis que reforçarien aquest fet, és que l'AAV9 no creua òptimament la BHE quan l'administració es fa en edats avançades en les que la barrera ja s'ha format per complet (Foust et al., 2009; Mateu-Bosch et al., 2024b). Cal destacar que, encara es manté incert quin és el mecanisme precís pel qual l'AAV9 creua la BHE. No obstant això, s'ha identificat que l'administració en nounats, període en el qual la BHE encara no s'ha acabat de formar, permet una millor transducció del vector al SNC en comparació amb adults, amb un BHE totalment madura (Slyk et al., 2024). S'especula que això es deu al canvi en l'estructura de la BHE al llarg del seu desenvolupament. En períodes primerencs l'endoteli, que revesteix els vasos sanguinis cerebrals, és encara immadur i permet la difusió de l'AAV9 a través del trencament temporal de les unions estretes, permetent la transducció a neurones, astròcits i micròglia. En canvi, en edats tardanes, l'endoteli cerebral ja madur es converteix en una barrera envoltada per astròcits que impedeixen la permeabilitat de la BHE. Això provoca que en aquestes edats, l'AAV9 tot i transduir al endoteli no sigui capaç de superar la barrera glial, i la seva biodistribució sigui principalment a astròcits i cèl·lules endotelials, impedit l'arribada a neurones o micròglia (Figura 5.2) (Liu et al., 2021; Lowenstein, 2009; Wu et al., 2023).

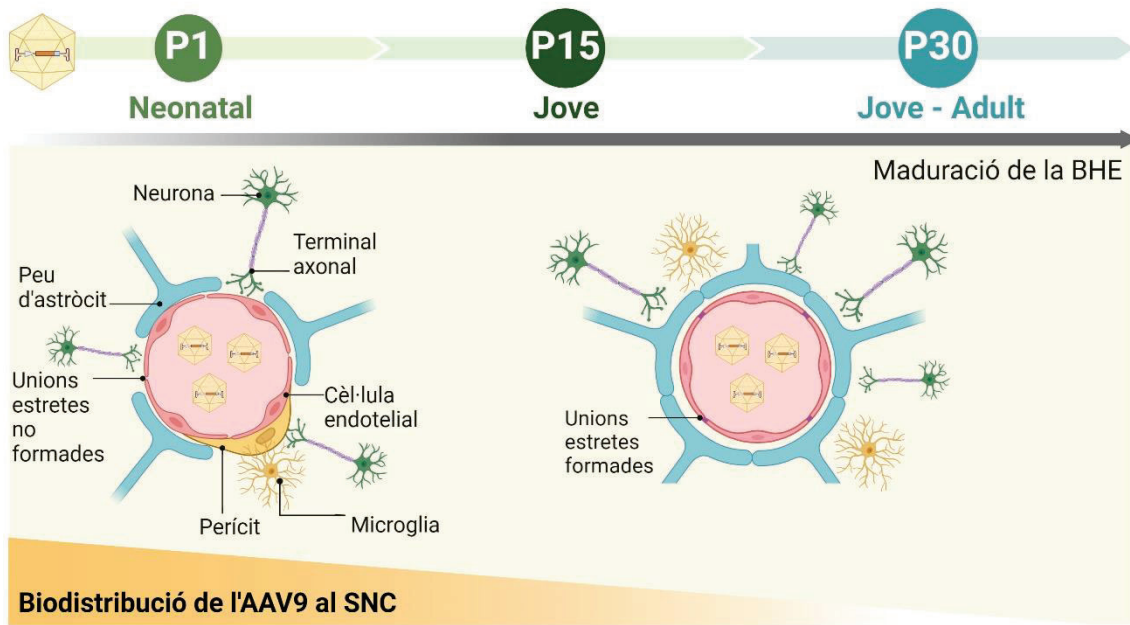


Figura 5.2. Representació esquemàtica de la biodistribució del AAV9 al sistema nerviós central (SNC) en funció de l'edat d'administració per via intravenosa i la maduració de la barrera hematoencefàlica (BHE). Figura adaptada de Lowenstein, 2009.

L'administració locoregional de l'AAV9_miR_AASS a través de la via de cisterna magna va mostrar una eficiència lleu de transducció a l'estriat, sense mostrar reducció en l'acumulació de metabòlits. En canvi, a fetge s'observava una òptima transducció i efecte de l'AAV9_miR_AASS, mostrant un comportament similar a l'administració IV donant lloc a una disminució de la expressió d'AASS i una reducció de l'acumulació dels metabòlits neurotòxics. Prèviament a la bibliografia ja s'havia reportat aquest mateix efecte de redistribució a la circulació sistèmica per part de l'AAV9 quan aquest s'administra via locoregional al CSF en animals rosegadors (Dirren et al., 2014; Haurigot et al., 2013; Schuster et al., 2014). Per contra, en estudis en primats no humans i en humans, se segueix apostant per administracions locoregionals al CSF com la CM per la seva transducció local al SNC i la seva modesta biodistribució a fetge (Samaranch et al., 2012; Taghian et al., 2020). Aquest fet, evidencia la diferència interespecie en la biodistribució del vector AAV9, i qüestiona l'ús d'aquests models preclínic per al desenvolupament translacional de teràpies gèniques (Schuster et al. 2014).

El vector amb serotip modificat, l'AAV9_p31_miR_AASS, va revelar ser l'única estratègia amb una òptima biodistribució i eficiència de silenciament de l'AASS en

fetge i estriat, en administració IV en edat jove-adulta (P30). Tanmateix, per a futurs estudis es va desestimar l'ús del serotip modificat, ja que d'aquest no hi havia evidències científiques de la seva funcionalitat en humans. De fet, es coneix que l'AAV9_p31 interacciona de forma molt eficient amb l'anhidrasa carbònica tipus IV de ratolí, però no amb la humana (Shay et al., 2023; Zhang et al., 2024). En la mateixa línia, un estudi recent ha revelat la diferència en la capacitat de transducció del AAV9_p31 al SNC de ratolins, rates i primats no humans, degut a una diferència en la penetrància de la BHE entre les espècies (Bunuales et al. 2024).

Així doncs, l'estudi de l'administració a edat neonatal IV va confirmar que l'AAV9 s'ha d'administrar en edats primerenques per poder creuar la BHE, i així arribar al SNC. Seguint aquesta estratègia, es va determinar que l'AAV9_miR_AASS induïa un bon silenciament de l'AASS, i l'administració de la dosi alta (5×10^{13} vg/kg) permetia prevenir de l'acumulació de metabòlits neuro tòxics en la regió estriatal. A més, el fet d'estudiar en paral·lel la dosi alta (5×10^{13} vg/kg) i la dosi baixa ($7,5 \times 10^{12}$ vg/kg), en el mateix període d'administració P1, i que amb les dues condicions es detectés transducció de l'AAV9_miR_AASS a la regió estriatal, suggeria que la biodistribució del vector terapèutic al SNC venia donada pel temps d'administració i no per la dosi. De fet, en l'administració a P30 a la dosi de $7,5 \times 10^{12}$ vg/kg no es va observar transducció en la regió estriatal. En conjunt, aquests resultats recolzen la importància d'un temps d'administració primerenc per a la òptima transducció de l'AAV9 al SNC.

Un factor a destacar de la comparativa entre les administracions a diferents edats del desenvolupament post-natal va ser la dosi administrada. Els rangs d'administració en assajos clínics amb diferents serotips d'AAV es troba entre 2×10^{11} i 2×10^{14} vg/kg per pacient en administracions sistèmiques, i de 1×10^9 a 1×10^{13} vg/pacient en administracions locals. S'ha descrit l'evidència d'una dependència entre la dosi administrada i la manifestació d'efectes adversos no desitjats, així doncs, cal optimitzar la dosi tenint en compte la toxicitat i l'eficàcia terapèutica (Au et al., 2022). Pel que fa a aquest estudi, es va treballar amb dosis que es trobaven dins del rang de seguretat descrit prèviament a la bibliografia. Les dosis seleccionades: 5×10^{13} vg/kg a P1, $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg a P15 i $7,5 \times 10^{12}$ vg/kg a P1 i P30, van seguir una tendència inversament proporcional a l'edat en el període

d'administració, havent administrat la dosi més alta a P1 i la més baixa a P30. Això es va fer així, ja que s'ha descrit que quan l'AAV s'administra a pacients molt joves, en etapa neonatal, tant sigui en ratolins o primats no humans, es pateix un descens de la quantitat del transgèn terapèutic del rAAV episomal durant el creixement de l'òrgan que s'ha transduït, fenomen conegut com a efecte de dilució (Kavita et al., 2023). Així doncs, l'administració de dosis més altes a P1 permetia prevenir aquest efecte de dilució en diferents teixits al llarg del temps. Tanmateix, l'anàlisi de l'efecte de l'AAV9_miR_AASS als sis mesos post-administració va mostrar que si bé en estriat es mantenia el silenciament de l'AASS, en fetge no s'observava aquesta tendència, evidenciant l'efecte de dilució del vector i la influència que hi té el creixement dels teixits i la divisió cel·lular. El fet que en el nucli estriat es mantingui l'efecte a llarg termini, indicaria que en aquest cas, la dilució del vector no tindria un impacte tan gran. De fet, el creixement del cervell i el fetge és força diferent en ratolí, així s'ha descrit que el pes cerebral de ratolins C57BL/6J entre els dies 17 postnatal (P17) i P60 no mostra diferències significatives, mentre que el fetge de ratolí es quadruplica entre els períodes de P21 a P60 (Gong et al., 2020; Zong et al., 2015). Els nostres resultats concorden amb altres estudis de teràpia gènica, que han descrit que en fetge es dona una disminució lenta i constant dels nivells de productes transgènics, mentre que les teràpies gèniques orientades a neurones, cardiomiòcits i cèl·lules del múscul esquelètic confereixen una major durabilitat a llarg termini (Kavita et al., 2023; Sun & Liao, 2022). Tot i que es podria pensar en la implicació de mecanismes de silenciament epigenètic del promotor CAG teixit-depenent, hi ha molts estudis que evidencien el manteniment de l'expressió a llarg termini en fetge de transgens regulats per aquest promotor (Kosuga et al. 2000).

5.3. Eficàcia terapèutica de l'AAV9_miR_AASS en el model murí d'AG1 quan s'administra per via intravenosa en l'etapa neonatal

Els ratolins *Gcdh*^{-/-} presenten un fenotip lleu fet que impedeix l'avaluació òptima de qualsevol aproximació terapèutica. Així doncs, els ratolins d'estudi es van exposar a dieta alta en lisina (HLD – 4,7%) just després del deslletament. S'ha descrit que l'alimentació dels ratolins *Gcdh*^{-/-} amb HLD provoca alteracions bioquímiques i neuropatològiques que s'assimilen a les crisis encefalopàtiques que es produeixen en individus amb AG1 (Sauer et al. 2011; Zinnanti et al. 2006).

En primer lloc, l'anàlisi de l'efecte de l'exposició a HLD sobre l'expressió de proteïna de l'AASS, va revelar que tant ratolins WT com en *Gcdh*^{-/-}, mostraven un augment significatiu dels nivells d'AASS quan l'animal es va exposar a HLD respecte a una dieta estàndard (condició SD). Això seria consistent amb resultats ja descrits prèviament, en que es va detectar una inducció de l'activitat hepàtica del LKR, domini responsable del primer pas enzimàtic de l'AASS, en ratolins alimentats amb dieta rica en proteïna. Aquest efecte, que també s'ha descrit en rates, plantes, ocells, peixos i cultius cel·lulars, s'explica per una regulació post-traducciona de l'AASS en condicions d'alta quantitat de lisina (Foster et al. 1993; Kiess et al. 2008).

L'estudi del grup experimental en el que es va combinar l'administració de l'AAV9_miR_AASS i l'exposició a HLD, va concloure que tot i la contrarietat d'efectes que generen les dues intervencions, s'obtenia una disminució significativa de l'AASS en el nucli estriat fins als sis mesos post-tractament. En la mateixa línia es va demostrar l'efecte del vector terapèutic en els nivells de metabòlits dicarboxílics, on es va observar que l'AAV9_miR_AASS prevenia de l'acumulació dels compostos neurotòxics fins als cinc mesos d'exposició a HLD. És a dir, l'efecte de l'AAV9_miR_AASS en estriat seria suficientment potent com per contrarestar la inducció d'AASS induïda per l'HLD.

Per contra, en fetge, no es va observar silenciament de l'expressió de proteïna de l'AASS sota l'exposició a HLD a curt o llarg termini, i únicament es va mostrar un efecte parcial sobre el nivells de metabòlits als sis mesos post-tractament. Tanmateix, en sèrum, sí que es va detectar un efecte de prevenció de l'acumulació

de GA i 3-OHGA en els dos temps d'estudi. Segurament, aquesta discrepància entre el fetge i la resta de teixits d'estudi en l'efecte de l'AAV9_miR_AASS en condicions de HLD, era degut a que en condicions basals l'efecte de HLD sobre la inducció de l'activitat de l'AASS en fetge era molt superior que en estriat. Cal destacar que, el fetge és un dels teixits amb major abundància de mRNA i proteïna d'AASS i GCDH, i un dels principals teixits on es dona la degradació de la lisina (Benevenga & Blemings, 2007; Gatrell et al., 2013; Matthews, 2020). Així doncs, aquest teixit mostraria major susceptibilitat a la inducció de la via del catabolisme per part de la HLD, i a conseqüència d'això, els alts nivells d'expressió i d'activitat d'AASS podrien emascarar l'efecte del vector terapèutic a nivell de proteïna i quantitat de metabòlits generats.

En individus afectes d'AG1 així com en els models animals *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD, l'augment de nivells dels metabòlits dicarboxílics al SNC són els responsables de desencadenar alteracions al nucli estriatal. Tot i que els mecanismes pels quals GA i 3-OHGA provoquen danys al SNC no es coneixen del tot, alguns estudis han descrit els metabòlits com a moduladors de la neurotransmissió glutamatèrgica i GABAèrgica donant lloc a mecanismes d'excitotoxicitat cel·lular, deteriorament del metabolisme energètic i estrès oxidatiu (Busanello et al., 2013; Rodrigues et al., 2015; Wajner et al., 2019). Aquests mecanismes porten a la degeneració estriatal que en pacients d'AG1 es manifesta en lesions cerebrals associades a l'astroglíosis reactiva, pèrdua neuronal, mielinització retardada i canvis de la substància blanca (Funk et al., 2005; Goodman et al., 1977; Mohammad et al., 2015; Nunes et al., 2013; Pérez-Dueñas et al., 2009; Pierson et al., 2015; Soffer et al., 1992). Pel que fa a estudis en teixits i cèl·lules derivades de models de ratolí i rata, s'ha descrit la pèrdua neuronal i formació de vacuoles al nucli estriatal, alteracions en substància blanca, la interrupció de la mielinització i un augment de la gliosi (Gonzalez Melo et al., 2021b; Olivera-Bravo et al., 2015; Wajner et al., 2019).

Les anàlisis histològiques de la regió estriatal van mostrar la presència considerable de vacuoles en ratolins *Gcdh*^{-/-} en HLD, revelant una progressió de les lesions als sis mesos d'edat a causa de l'exposició crònica a HLD. Aquests resultats eren similars als reportats en estudis previs, on s'ha relacionat l'aparició de vacuoles en models de rosegadors d'AG1 amb un estat de desequilibri del metabolisme energètic i estrès

oxidatiu induït per l'exposició a HLD (Amaral et al., 2019; Gonzalez Melo et al., 2021b; Seminotti et al., 2016; Zinnanti et al., 2006). Seminotti i col·laboradors han realitzat nombrosos estudis destacant que en models murins d'AG1 la sobrecàrrega de lisina imita la condició insidiosa i progressiva de l'AG1 humana, i provoca un estrès oxidatiu notable associat a alteracions histopatològiques a l'estriat i l'escorça cerebral, però no en teixits perifèrics. Més enllà, estudis en paràmetres bioquímics han mostrat un augment de peroxidació lipídica i de la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que van servir a mode de biomarcador per avaluar l'eficàcia d'una possible estratègia terapèutica neuroprotector (Seminotti et al., 2013, 2022, 2012). Seguint la mateixa línia, les nostres dades van corroborar aquests fets ja reportats, observant un augment del dany oxidatiu en lípids i en DNA en estriat de ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD a curt i llarg termini. A més, es va detectar la presència de vacuoles concentrades principalment en regions de substància blanca, indicant alteracions en aquesta àrea que també s'han observat en pacients com a conseqüència de les crisis encefalopàtiques (CEA) (Olivera-Bravo et al., 2019; Wajner et al., 2019). L'acció de l'AAV9_miR_AASS va permetre evitar la inducció de la peroxidació lipídica derivada de la sobrecarrega de lisina, que podria explicar la millora notable de l'alteració morfològica després d'un i sis mesos de teràpia, tot i l'alimentació amb HLD perllongada. Això indicaria un efecte protector del vector terapèutic en l'aparició de la vacuolació, tot i l'exposició a HLD constant.

En cervells post-mortem d'individus afectes d'AG1 s'ha detectat un augment en la gliosi (Funk et al., 2005; Goodman et al., 1977). A més de les seves múltiples funcions, els astròcits responen al dany cerebral amb l'astrogliosi com a mecanisme de defensa de les neurones circumdants, aquest provoca un canvi en la morfologia dels astròcits, la formació de cicatrius i, en casos extrems, la inhibició de la regeneració d'axons neuronals (De Keyser et al., 2008). Els resultats d'immunoreactivitat glial van mostrar un augment del marcatge d'astròcits reactius en ratolins *Gcdh*^{-/-} a HLD que progressava amb l'edat del ratolí, indicant una tendència en augment del dany estriatal. El marcatge de GFAP, com a marcador glial, es trobava formant agregacions situades majoritàriament al voltant de les vacuoles, indicant una resposta dels astròcits enfront a la lesió causada per l'aparició de les vacuoles. Els resultats corroboraven allò descrit en altres estudis realitzats en altres models rosegadors (Amaral et al., 2019; Gonzalez Melo, et al., 2021b; Mateu-Bosch

et al., 2024b; Zinnanti et al., 2006) i en línies cel·lulars provinents d'aquests, en els quals es suggeria el paper dels astròcits en la neuropatologia de l'AG1 i es destacava la vulnerabilitat dels astròcits al efecte de la lisina enfront a altres tipus cel·lulars (Cudré-Cung et al., 2019; Olivera-Bravo & Barbeito, 2015; Olivera-Bravo et al., 2011, 2015; Rodrigues et al., 2017). També en aquest cas, l'administració del vector terapèutic en condicions de HLD va mostrar una recuperació de l'estat de l'astrogliosi de la regió estriatal, indicatiu de menor dany cerebral.

Individus afectes d'AG1 han mostrat signes d'hipomielinització o retardament en la mielinització, especialment s'ha reportat en aquells pacients amb debut tardà o insidiós, posicionant aquesta afectació com a independent de les CEA (Boy et al., 2017; Harting et al., 2009). El marcatge de MBP, per la mielina, va revelar una disminució en els nivells de mielinització en els ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD fins als sis mesos d'edat. Més enllà de la reducció de les àrees de mielinització, es va observar la coincidència de presència de vacuoles en els feixos axonals en l'estriat. Aquest fet ja s'havia descrit anteriorment per Olivera-Bravo i col·laboradors, que també havien destacat una disminució significativa de les àrees estriatals mielinitzades i una vacuolació progressiva de la substància blanca en ratolins adults *Gcdh*^{-/-} (Olivera-Bravo et al., 2019). Pel que fa al grup homòleg tractat amb el vector AAV9_miR_AASS, es va mostrar una recuperació del marcatge de MBP, assimilant-se al fenotip del grup *Gcdh*^{-/-} a SD. Els defectes en la mielinització en les malalties metabòliques hereditàries s'han relacionat amb alteracions en la sinapsi neuronal i problemes motors, ambdós factors presents en la neuropatologia de l'AG1 (Saudubray & Garcia-Cazorla, 2018). Així doncs, es podria hipotetitzar que el rescat de la hipomielinització per part del vector terapèutic podria revertir defectes sinàptics i actuar com a neuroprotector enfront el fenotip agressiu estriatal que indueix la HLD.

En pacients d'AG1 s'ha destacat la pèrdua de neurones estriatals dins del marc de neurodegeneració cortical progressiva i d'alteració de la substància blanca causades per les CEA (Funk et al., 2005; Garbade et al., 2014; Goodman & Frerman, 2001). Tanmateix, les anàlisis de immunodetecció de NeuN, per neurones, realitzades en aquest treball no van mostrar diferències en l'abundància neuronal entre els grups i condicions experimentals. Entre els diferents estudis existents a la bibliografia amb

models murins hi ha discrepàncies sobre el paper i l'afectació neuronal en els models d'AG1. Mentre que des d'un inici diferents autors han demostrat la pèrdua neuronal en ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a HLD (Sauer et al., 2015; Seminotti et al., 2013; Zinnanti et al., 2007, 2006). Altres estudis han destacat l'absència de mort neuronal en diferents models d'AG1, fins i tot en condicions d'exposició a HLD, indicant que la supervivència neuronal es dona independentment de la lesió provocada en la matèria blanca a l'estriat dels ratolins *Gcdh*^{-/-} (Cudré-Cung et al., 2019; Mateu-Bosch et al., 2024b; Olivera-Bravo et al., 2019). No obstant això, aquests estudis sí que revelaven una disminució en la densitat d'axons i dendrites neuronals, que es mostraven encara més reduïdes després de l'exposició a HLD. Aquest fet estaria en concordança per una banda, amb els nostres resultats d'hipomielinització, i per altra, amb el retard en el desenvolupament neuronal suggerit per observacions de ressonància magnètica en pacients amb AG1 (Cudré-Cung et al., 2019). D'aquesta divergència sobre l'estat neuronal ha sorgit com a principal hipòtesi la possible baixa vulnerabilitat cap als metabòlits neurotòxics que tenen les neurones de ratolí, respecte a altres tipus cel·lulars com els astròcits que serien més susceptibles a lesions derivades de l'acumulació de GA i 3-OHGA (Olivera-Bravo & Barbeito, 2015; Schmiesing et al., 2017). Olivera-Bravo i col·laboradors han proposat que una disfunció primària en la maduració dels astròcits degut a l'exposició als metabòlits neurotòxics, provocaria alteracions morfològiques perllongades conduint a una incapacitat de donar suport a les xarxes sinàptiques, així com defectes en la mielinització i en la maduració de la BHE. No seria, fins estadis molt avançats que es donaria un efecte en la degeneració neuronal provocant-ne la mort (Olivera-Bravo & Barbeito, 2015; Olivera-Bravo et al., 2019). El fet que el present estudi compregui únicament estudis fins a cinc mesos en HLD i sis mesos post-tractament amb el vector terapèutic, ens situaria en un escenari en el que probablement encara no hauria tingut lloc la mort neuronal, però sí la hipomielinització que donaria lloc a deficiències axonals.

El fet que els pacients d'AG1 no presentin signes greus d'alteracions en la funció hepàtica ha fet que aquest aspecte pràcticament no s'hagi estudiat en models animals. Tanmateix, el model d'inducció de fenotip sever per exposició crònica a HLD utilitzat en aquest estudi, ens feia pensar que podria impactar en la funció hepàtica. De fet, les anàlisi de la caracterització hepàtica van mostrar alteracions en

el grup *Gcdh*^{-/-} exposat a HLD en l'activitat de la fosfatasa alcalina (ALP), i el nivell de colesterol i triglicèrids circulants, mentre que el nivell total de proteïna es va mantenir com el grup WT. Aquest fet podria indicar que en condicions de HLD es dona certa alteració en la funció hepàtica relacionada amb l'obstrucció o inflamació del conducte biliar que desencadenaria una alteració específica de les vies del metabolisme lipídic dels hepatòcits (Arvind et al., 2019; Dhillon & Steadman, 2012). Aquestes observacions es mostraven concordants amb l'estudi histològic, en el que als sis mesos d'edat de ratolins *Gcdh*^{-/-} van mostrar alteracions en la morfologia dels hepatòcits amb vacuolació i microgranulomes infiltrats. A més, en l'exposició a HLD al llarg de cinc mesos es va observar major dany hepàtic. Tot i que és necessari aprofundir en aquests estudis, el que vam observar és que el tractament amb l'AAV9_miR_AASS va mostrar una recuperació parcial de les alteracions hepàtiques, sobretot en les condicions menys agressives, indicant certa acció terapèutica. Hem de tenir present que, amb l'estratègia utilitzada d'administració a P1 havíem observat en fetge un efecte de dilució del vector terapèutic per creixement de l'òrgan que podria mitigar en alguns casos l'efectivitat de la teràpia.

La sobrecàrrega de lisina en el model *Gcdh*^{-/-} mostrava clarament un impacte en l'evolució del pes corporal i la supervivència dels ratolins probablement com a resultat d'una activitat espontània i hipotèrmia reduïda, que progressava cap a una reducció de la ingesta d'aliments fins a la pèrdua de pes tal i com s'havia proposat (Gonzalez Melo et al., 2021b; Sauer et al., 2015). El descens en el pes es produïa durant els primers dies d'exposició a HLD, i es mantenia significativament reduït en comparació als animals WT, al llarg dels cinc mesos d'alimentació amb HLD. El tractament amb el vector terapèutic permetia que els animals guanyessin pes de forma anàloga als ratolins WT fins als 75 dies d'exposició a HLD, tres mesos i mig post-tractament. Després d'aquest període el pes es va mantenir en valors inferiors als WT, probablement degut a la severitat de l'alimentació perllongada amb HLD.

Alguns dels ratolins *Gcdh*^{-/-} que patien major pèrdua de pes els primers dies d'exposició a HLD veien compromesa la seva supervivència, tal i com altres autors ja havien observat (Sauer et al., 2015; Zinnanti & Lazovic, 2010; Zinnanti et al., 2006). De fet, aquest impacte en la supervivència ha estat una mesura d'eficàcia terapèutica en diferents estudis que avaluen opcions terapèutiques per a l'AG1

(Barzi et al., 2023; Guo et al., 2022b; Mateu-Bosch et al., 2024b). En aquest treball també s'ha analitzat, i s'ha pogut observar que la cohort tractada amb el vector terapèutic revertia aquesta situació de compromís de la viabilitat fins als sis mesos post-tractament. En comparació amb les altres estratègies terapèutiques per a l'AG1, la supervivència obtinguda en el grup tractat amb l'AAV9_miR_AASS va ser lleugerament menor que en estratègies de reemplaçament enzimàtic de la proteïna defectiva (Guo et al., 2022b; Mateu-Bosch et al., 2024b). Tanmateix, es va mostrar similar a la viabilitat d'un estudi en el que també s'inhibia l'AASS en un model AG1, mitjançant una estratègia d'edició genètica per CRISPR/Cas9 (Barzi et al. 2023).

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi suggereixen que la inhibició de l'activitat de l'AASS podria postular-se com a teràpia per a l'AG1. Per una banda, aporten un gruix d'evidències científiques que demostren que la via de la sacaropina és la principal font de producció d'AG i 3-OHGA, i que la seva inhibició és beneficiosa per al model de ratolí AG1 mitjançant teràpia gènica (Figura 5.3). A més a més, obre les portes a explorar altres aproximacions terapèutiques per tal de reduir l'activitat de l'AASS, com per exemple mitjançant petites molècules inhibidores, o el plantejament d'una inhibició dirigida a teixit.

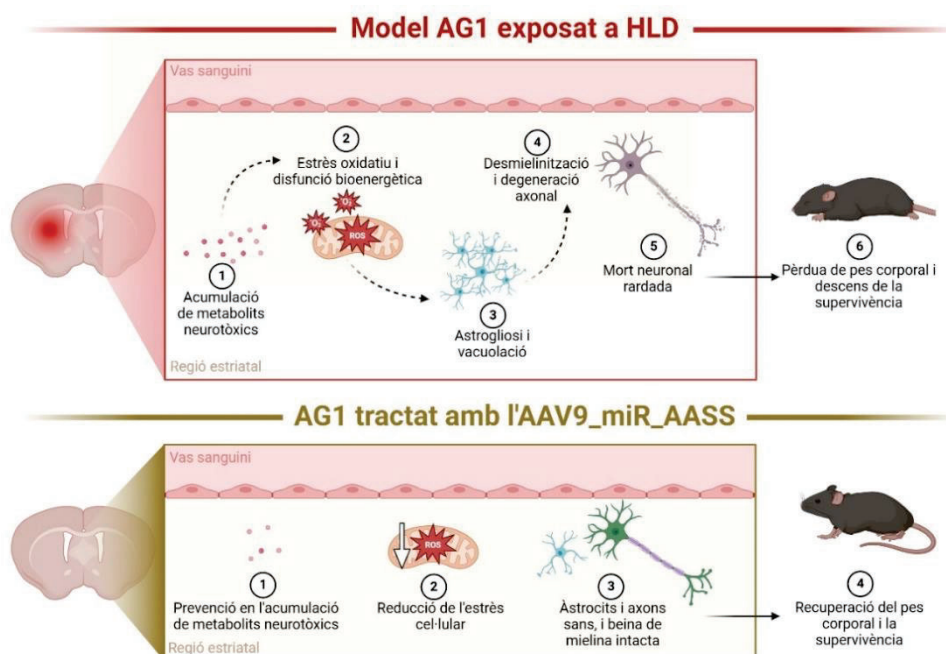


Figura 5.3. Representació esquemàtica dels mecanismes fisiopatològics dels ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a dieta alta en lisina (HLD) i dels beneficis que aporta l'administració intravenosa neonatal de l'AAV9_miR_AASS. Model d'acidúria glutàrica tipus I (AG1) exposat a HLD: principals alteracions neuropatològiques descrites al llarg de l'estudi. AG1 tractat amb l'AAV9_miR_AASS: principals beneficis del vector terapèutic.

5.4. Perspectives de translació de la teràpia a la clínica

L'administració de l'AAV9_miR_AASS en període neonatal per via sistèmica intravascular ha demostrat ser eficient en la transducció als teixits diana de l'AG1, per prevenir l'acumulació de metabòlits, protegir de la neuropatologia i restablir la supervivència. Tenint en compte que l'AG1 es caracteritza per un debut primerenc, la present proposta terapèutica permetria l'administració no invasiva en un període previ a aquestes etapes de major risc a patir CEA, sent un escenari ideal aplicar aquest tractament després de la detecció mitjançant els Programes de Cribratge Neonatal. A més, en els pacients que presenten un debut clínic, s'ha reportat que una intervenció terapèutica, sigui la dietètica actual o una d'alternativa, des d'edats primerenques suposa una millora significativa en l'evolució dels pacients (Boy et al., 2018). És destacable que, agències regulatòries com la FDA han aprovat l'administració de teràpies gèniques en edat pediàtriques, concretament *Zolgensma* per a infants menors de dos anys amb atrofia muscular espinal (Ogbonmide et al. 2023).

Un altre factor clau per a la translació clínica, és que al llarg de les diferents anàlisis realitzades amb el vector control tant a nivell neurològic com hepàtic, es va demostrar que els animals tractats amb l'AAV9_miR_Sc s'assimilaven a la seva condició homòloga salina. Aquest fet, en termes de seguretat del vector, indicaria que la seqüència nucleotídica, la dosi de l'AAV, i la via i període d'administració no estarien provocant cap tipus de neuro o hepatotoxicitat. Així doncs, l'estratègia terapèutica proposada en aquest treball, esdevindria una aproximació amb evidències de seguretat per a la translació a futurs estudis pre-clínic i clínic.

A més, pel que fa l'efecte del AAV9_miR_AASS, es va confirmar que la teràpia proposada de regulació de l'AASS a nivell post-transcripcional no mostrava cap agreujament neurofisiològic ni hepàtic en comparació amb el grup *Gcdh*^{-/-} salí. En definitiva, i tal com s'havia descrit la hiperlisenèmia es postulava com a una entitat benigna, i com a possible diana terapèutica per a estudis de teràpies de reducció de substrat per a MMH amb defectes a la via de degradació de la lisina (Leandro & Houten, 2020). Seguint aquesta línia, aquesta estratègia es podria considerar també com a aproximació terapèutica per a l'epilèpsia dependent de piridoxina (EDP),

proposta que ja s'ha publicat prèviament per Leandro i col·laboradors (Leandro et al., 2020; Leandro & Houten, 2020). L'EDP és una malaltia del metabolisme de la lisina que es caracteritza bioquímicament pel defecte del tercer enzim de la via catabòlica (AASA), i l'acumulació de metabòlits que se'n deriva és el responsable de l'aparició de trastorns neurològics. Així doncs, evitant el catabolisme de la lisina mitjançant la inhibició de la via metabòlica en el primer pas enzimàtic, es reduiria l'acumulació de metabòlits neurotòxics. En aquest context s'està treballant en el marc del consorci europeu CHARLIE i s'espera poder estudiar aquesta teràpia en models murins d'EDP.

En relació a les altres aproximacions de teràpia gènica estudiades per a l'AG1, les més prometedores són aquelles basades en el reemplaçament genètic del *Gcdh* (Barzi et al., 2023; Guo et al., 2022b; Mateu-Bosch et al., 2024b) i la reducció de substrat mitjançant la inhibició de l'AASS (Barzi et al., 2023; Leandro et al., 2020). Tanmateix, cal destacar que aquest és el primer treball que presenta una proposta viable terapèutica de silenciament de l'AASS, ja que en les anteriors publicacions la inhibició de l'expressió del AASS s'ha fet de forma germinal mitjançant enginyeria genètica, fet que ho fa impossible de traslladar a la clínica. Respecte al reemplaçament genètic, totes les aproximacions es basen en un AAV administrat per via sistèmica o intracerebroventricular, mentre els treballs de Guo i Mateu-Bosch proposen una teràpia gènica dirigida al SNC, Barzi exposa una teràpia gènica dirigida al fetge. Tot i les divergències entre elles, els paràmetres estudiats en els estudis pre-clínic dels diferents abordatges suggeririen un efecte similar entre ells i també en relació a l'eficàcia terapèutica de la nostra proposta de reducció de substrat. Així doncs, el potencial benefici d'apostar per la teràpia de reducció de substrat, seria la possibilitat de donar lloc al desenvolupament d'un únic producte terapèutic en un període previ al debut clínic, per a dues malalties de la mateixa via catabòlica. Tenint en compte el repte científic, econòmic i regulatori que comporta el desenvolupament d'un producte terapèutic basat en teràpia gènica (Arabi et al., 2022), la nostra proposta suposaria una oportunitat per a l'AG1 i l'EDP, les quals actualment no disposen de teràpia.

6.CONCLUSIONS

1. El miR_AASS dissenyat, basat en el mecanisme d'interferència d'RNA, té capacitat d'induir el silenciament de l'AASS en cèl·lules murines i humanes.
2. L'administració del vector AAV9_miR_AASS en edat jove-adulta del model de ratolí d'AG1, mostra transducció, inhibició de l'AASS i reducció de metabòlits al fetge quan s'administra per via intravenosa i cisterna magna. Tanmateix, la transducció al nucli estriat, el qual és el teixit diana, només s'observa de forma lleu després d'una administració via cisterna magna.
3. L'administració per via intravenosa del vector amb serotip modificat AAV9_p31_miR_AASS en edat jove-adulta del model de ratolí, mostra una transducció eficient en fetge i estriat. Aquesta, dona lloc a una inhibició de l'expressió de l'AASS i a la prevenció de l'acumulació de metabòlits, suggerint el potencial d'aquest vector.
4. L'administració del vector AAV9_miR_AASS per via intravenosa en edat neonatal mostra una òptima transducció a fetge i estriat, que resulta en una reducció significativa de l'expressió de la proteïna AASS, a un mes post-tractament. En el nucli estriat aquest efecte es manté fins als sis mesos després de la teràpia, mentre que en fetge es recupera l'expressió de l'AASS, probablement com a resultat de l'efecte de dilució del vector. No obstant això, el vector terapèutic evita l'acumulació crònica dels metabòlits dicarboxílics en els teixits perifèrics i la regió estriatal.
5. La caracterització del model de ratolí d'AG1 amb exposició a dieta alta en lisina ha permès estudiar l'efecte terapèutic de les alteracions neurofisiopatològiques característiques de la malaltia, així com les alteracions hepàtiques poc estudiades fins al moment. Això demostra la idoneïtat d'aquest model per a l'estudi de noves aproximacions terapèutiques per l'AG1.
6. En context de dieta alta en lisina, l'administració intravenosa neonatal de l'AAV9_miR_AASS té la capacitat de prevenir la inducció del fenotip bioquímic sever al SNC, fins als sis mesos post-tractament. Evidenciant així, un efecte neuroprotector, sobre la formació de vacuoles, l'aparició d'astrogliosi, la

pèrdua de mielina i el dany oxidatiu a DNA i lípids fins a 6 mesos post-tractament.

7. Els ratolins model d'AG1 exposats de manera perllongada a HLD mostren evidències d'alteració hepàtica, que millora parcialment amb l'administració intravenosa neonatal de l'AAV9_miR_AASS.
8. L'aplicació de la teràpia AAV9_miR_AASS per via intravenosa en l'etapa neonatal rescata la pèrdua de pes i la supervivència compromesa dels ratolins *Gcdh*^{-/-} exposats a dieta alta en lisina.

Aquests resultats demostren que la inhibició del catabolisme de la lisina en el model ratolí d'AG1 mitjançant el vector terapèutic AAV9_miR_AASS, permet prevenir l'acumulació de metabòlits i les alteracions neuropatològiques associades, fins a restablir la supervivència dels ratolins.

7. BIBLIOGRAFIA

A

- Amaral, A. U., Seminotti, B., Cecatto, C., Fernandes, C. G., Busanello, E. N. B., Zanatta, Â., ... Wajner, M. (2012). Reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity and expression in cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: a possible mechanism for brain injury in glutaric aciduria type I. *Molecular Genetics and Metabolism*, 107, 375–382.
- Amaral, A. U., Seminotti, B., da Silva, J. C., de Oliveira, F. H., Ribeiro, R. T., Leipnitz, G., ... Wajner, M. (2019). Acute lysine overload provokes marked striatum injury involving oxidative stress signaling pathways in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice. *Neurochemistry International*, 129, 104467.
- Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual Review of Medicine*, 70, 273–288.
- Arabi, F., Mansouri, V., & Ahmadbeigi, N. (2022). Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113324.
- Arvind, A., Osganian, S. A., Cohen, D. E., & Corey, K. E. (2019, July 21). Lipid and Lipoprotein Metabolism in Liver Disease. *Endotext [Internet]*. Accés: 27 setembro 2024.
- Atchison, R. W., Casto, B. C., & Hammon, W. M. D. (1965). Adenovirus-associated defective virus particles. *Science*, 149, 754–756.
- Au, H. K. E., Isalan, M., & Mielcarek, M. (2022). Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. *Frontiers in Medicine*, 8, 809118.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., & Bosch, F. (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Current Gene Therapy*, 10, 423–436.

B

- Baric, I., Wagner, L., Feyh, P., Liesert, M., Buckel, W., & Hoffmann, G. F. (1999). Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 22, 867–882.
- Barroso, M., Gertzen, M., Puchwein-Schwepecke, A. F., Preisler, H., Sturm, A., Reiss, D. D., ... Gersting, S. W. (2023). Glutaryl-CoA Dehydrogenase Misfolding in Glutaric Acidemia Type 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 13158.
- Barzi, M., Johnson, C. G., Chen, T., Rodriguiz, R. M., Hemmingsen, M., Gonzalez, T. J., ... Bissig, K. D. (2023). Rescue of glutaric aciduria type I in mice by liver-directed therapies. *Science Translational Medicine*, 15, eadf4086.
- Basinger, A. A., Booker, J. K., Frazier, D. M., Koeberl, D. D., Sullivan, J. A., & Muenzer, J. (2006). Glutaric acidemia type 1 in patients of Lumbee heritage from North Carolina. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88, 90–92.

- Begley, D. W., Davies, D. R., Hartley, R. C., Hewitt, S. N., Rychel, A. L., Myler, P. J., ... Stewart, L. J. (2011). Probing conformational states of glutaryl-CoA dehydrogenase by fragment screening. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 67, 1060–1069.
- Benevenga, N. J., & Blemings, K. P. (2007). Unique Aspects of Lysine Nutrition and Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 137, 1610–1615.
- Bernstein, L., Coughlin, C. R., Drumm, M., Yannicelli, S., & Rohr, F. (2020). Inconsistencies in the Nutrition Management of Glutaric Aciduria Type 1: An International Survey. *Nutrients*, 12, 1–9.
- Biagosch, C., Ediga, R. D., Hensler, S. V., Faerberboeck, M., Kuehn, R., Wurst, W., ... Prokisch, H. (2017). Elevated glutaric acid levels in Dhtkd1-/Gcdh- double knockout mice challenge our current understanding of lysine metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863, 2220–2228.
- Bjugstad, K. B., Crnic, L. S., Goodman, S. I., & Freed, C. R. (2006). Infant mice with glutaric acidemia type I have increased vulnerability to 3-nitropropionic acid toxicity. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, 612–619.
- Bofill-De Ros, X., & Gu, S. (2016). Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods (San Diego, Calif.)*, 103, 157–166.
- Borel, F., van Logtenstein, R., Koornneef, A., Maczuga, P., Ritsema, T., Petry, H., ... Konstantinova, P. (2011). In vivo knock-down of multidrug resistance transporters ABCC1 and ABCC2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs. *Journal of RNAi and Gene Silencing : An International Journal of RNA and Gene Targeting Research*, 7, 434.
- Bouchereau, J., & Schiff, M. (2020). Inherited Disorders of Lysine Metabolism: A Review. *The Journal of Nutrition*, 150, 2556S-2560S.
- Boy, N., Heringer, J., Brackmann, R., Bodamer, O., Seitz, A., Kölker, S., & Harting, I. (2017). Extrastriatal changes in patients with late-onset glutaric aciduria type I highlight the risk of long-term neurotoxicity. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12, 1–13.
- Boy, N., Mengler, K., Thimm, E., Schiergens, K. A., Marquardt, T., Weinhold, N., ... Kölker, S. (2018). Newborn screening: A disease-changing intervention for glutaric aciduria type 1. *Annals of Neurology*, 83, 970–979.
- Boy, N., Mengler, K., Heringer-Seifert, J., Hoffmann, G. F., Garbade, S. F., & Kölker, S. (2021a). Impact of newborn screening and quality of therapy on the neurological outcome in glutaric aciduria type 1: a meta-analysis. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 23, 13–21.

- Boy, N., Mohr, A., Garbade, S. F., Freisinger, P., Heringer-Seifert, J., Seitz, A., ... Harting, I. (2021b). Subdural hematoma in glutaric aciduria type 1: High excreters are prone to incidental SDH despite newborn screening. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44, 1343–1352.
- Boy, N., Mühlhausen, C., Maier, E. M., Ballhausen, D., Baumgartner, M. R., Beblo, S., ... Kölker, S. (2023). Recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type 1: Third revision. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 46, 482–519.
- Bross, P., Frederiksen, J. B., Bie, A. S., Hansen, J., Palmfeldt, J., Nielsen, M. N., ... Christensen, E. (2012). Heterozygosity for an in-frame deletion causes glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in a patient detected by newborn screening: investigation of the effect of the mutant allele. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35, 787–796.
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 1–24.
- Büning, H., Nicklin, S., Perabo, L., Hallek, M., & Baker, A. (2003). AAV-based gene transfer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 5, 367–375.
- Bunuales, M., Garduno, A., Chillon, M., Bosch, A., Gonzalez-Aparicio, M., Espelosin, M., ... Hernandez-Alcoceba, R. (2024). Characterization of brain transduction capability of a BBB-penetrant AAV vector in mice, rats and macaques reveals differences in expression profiles. *Gene Therapy*, 31, 455–466.
- Busanello, E. N. B., Pettenuzzo, L., Botton, P. H., Pandolfo, P., De Souza, D. O. G., Woontner, M., ... Wajner, M. (2013). Neurodevelopmental and cognitive behavior of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient knockout mice. *Life Sciences*, 92, 137–142.
- Busquets, C., Merinero, B., Christensen, E., Gelpí, J. L., Campistol, J., Pineda, M., ... Ribes, A. (2000). Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatric Research*, 48, 315–322.

C

- Cabrera, G. T., & Mueller, C. (2016). Design of shRNA and miRNA for Delivery to the CNS. *Methods in Molecular Biology*, 1382, 67–80.
- Castle, M. J., Turunen, H. T., Vandenberghe, L. H., & Wolfe, J. H. (2016). Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids. *Methods in Molecular Biology*, 1382, 133–149.
- Chandran, J., Ahmed Chowdhury, E., Perkinson, M., Jamier, T., Sutton, D., Wu, S., ... Meno-Tetang, G. M. L. (2023). Assessment of AAV9 distribution and transduction in rats after administration through Intrastriatal, Intracisterna magna and Lumbar Intrathecal routes. *Gene Therapy*, 30, 132–141.

- Chang, F. M. (2023). Update current understanding of neurometabolic disorders related to lysine metabolism. *Epilepsy & Behavior*, 146, 109363.
- Christensen, Ernst. (1993). A fibroblast glutaryl-CoA dehydrogenase assay using detritiation of 3H-labelled glutaryl-CoA: application in the genotyping of the glutaryl-CoA dehydrogenase locus. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry*, 220, 71–80.
- Christensen, E., Ribes, A., Merinero, B., & Zschocke, J. (2004). Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27, 861–868.
- Coughlin, C. R., van Karnebeek, C. D. M., Al-Hertani, W., Shuen, A. Y., Jaggumantri, S., Jack, R. M., ... Van Hove, J. L. K. (2015). Triple therapy with pyridoxine, arginine supplementation and dietary lysine restriction in pyridoxine-dependent epilepsy: Neurodevelopmental outcome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 116, 35–43.
- Coughlin, C. R., Swanson, M. A., Spector, E., Meeks, N. J. L., Kronquist, K. E., Aslamy, M., ... Van Hove, J. L. K. (2019). The genotypic spectrum of ALDH7A1 mutations resulting in pyridoxine dependent epilepsy: A common epileptic encephalopathy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42, 353–361.
- Coughlin, C. R., Tseng, L. A., Abdenur, J. E., Ashmore, C., Boemer, F., Bok, L. A., ... van Karnebeek, C. D. M. (2021). Consensus guidelines for the diagnosis and management of pyridoxine-dependent epilepsy due to α -amino adipic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44, 178–192.
- Crooke, S. T., Liang, X. H., Baker, B. F., & Crooke, R. M. (2021). Antisense technology: A review. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100416.
- Crowther, L. M., Mathis, D., Poms, M., & Plecko, B. (2019). New insights into human lysine degradation pathways with relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42, 620–628.
- Cudré-Cung, H. P., Remacle, N., do Vale-Pereira, S., Gonzalez, M., Henry, H., Ivanisevic, J., ... Ballhausen, D. (2019). Ammonium accumulation and chemokine decrease in culture media of Gcdh-/- 3D reaggregated brain cell cultures. *Molecular Genetics and Metabolism*, 126, 416–428.

D

- Daci, R., & Flotte, T. R. (2024). Delivery of Adeno-Associated Virus Vectors to the Central Nervous System for Correction of Single Gene Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 1050.
- Danhauser, K., Sauer, S. W., Haack, T. B., Wieland, T., Staufner, C., Graf, E., ... Kölker, S. (2012). DHTKD1 mutations cause 2-amino adipic and 2-oxoadipic aciduria. *American Journal of Human Genetics*, 91, 1082–1087.

- De Keyser, J., Mostert, J. P., & Koch, M. W. (2008). Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 267, 3–16.
- Deverman, B. E., Ravina, B. M., Bankiewicz, K. S., Paul, S. M., & Sah, D. W. Y. (2018). Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 17, 641–659.
- Dhillon, A., & Steadman, R. H. (2012). Liver Diseases. *Anesthesia and Uncommon Diseases: Sixth Edition*, 162–214.
- Dirren, E., Towne, C. L., Setola, V., Redmond, D. E., Schneider, B. L., & Aebischer, P. (2014). Intracerebroventricular injection of adeno-associated virus 6 and 9 vectors for cell type-specific transgene expression in the spinal cord. *Human Gene Therapy*, 25, 109–120.
- Dorum, S., Havalı, C., Görükmez, Ö., & Görükmez, O. (2020). Two patients with glutaric aciduria type 3: a novel mutation and brain magnetic resonance imaging findings. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 62, 657–662.
- du Moulin, M., Thies, B., Blohm, M., Oh, J., Kemper, M. J., Santer, R., & Mühlhausen, C. (2018). Glutaric Aciduria Type 1 and Acute Renal Failure: Case Report and Suggested Pathomechanisms. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 39, 25–30.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., ... Engelhardt, J. F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *Journal of Virology*, 72, 8568–8577.
- Dufour, B. D., & McBride, J. L. (2016). Intravascular AAV9 Administration for Delivering RNA Silencing Constructs to the CNS and Periphery. *Methods in Molecular Biology*, 1364, 261–275.
- Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359, eaan4672.

E

- Eberling, J. L., Jagust, W. J., Christine, C. W., Starr, P., Larson, P., Bankiewicz, K. S., & Aminoff, M. J. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, 70, 1980–1983.

F

- Ferreira, C. R., & van Karnebeek, C. D. M. (2019). Inborn errors of metabolism. *Handbook of Clinical Neurology*, 162, 449–481.
- Ferreira, C. R., Rahman, S., Keller, M., Zschocke, J., Abdenur, J., Ali, H., ... Zeviani, M. (2021). An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44, 164–177.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806–811.
- Foster, A. R., Scislawski, P. W. D., Ian Harris, C., & Fuller, M. F. (1993). Metabolic response of liver lysine α -ketoglutarate reductase activity in rats fed lysine limiting or lysine excessive diets. *Nutrition Research*, 13, 1433–1443.
- Foust, K. D., Nurre, E., Montgomery, C. L., Hernandez, A., Chan, C. M., & Kaspar, B. K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology*, 27, 59–65.
- Frank, F., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465, 818–822.
- Freudenberg, F., Lukacs, Z., & Ullrich, K. (2004). 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiology of Disease*, 16, 581–584.
- Fu, X., Gao, H., Tian, F., Gao, J., Lou, L., Liang, Y., ... Luo, X. (2014). Mechanistic effects of amino acids and glucose in a novel glutaric aciduria type 1 cell model. *PLoS One*, 9, e110181.
- Fuchs, H., Antonio Aguilar-Pimentel, J., Amarie, O. V, Becker, L., Calzada-Wack, J., Cho, Y.-L., ... Hrabě De Angelis, M. (2018). Understanding gene functions and disease mechanisms: Phenotyping pipelines in the German Mouse Clinic. *Behavioural Brain Research*, 352, 187–196.
- Funk, C. B. R., Prasad, A. N., Frosk, P., Sauer, S., Kölker, S., Greenberg, C. R., & Del Bigio, M. R. (2005). Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain: A Journal of Neurology*, 128, 711–722.
- Fusco, D. Di, Dinallo, V., Marafini, I., Figliuzzi, M. M., Romano, B., & Monteleone, G. (2019). Antisense Oligonucleotide: Basic Concepts and Therapeutic Application in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 305.

G

- Garbade, S. F., Greenberg, C. R., Demirkol, M., Gökçay, G., Ribes, A., Campistol, J., ... Kölker, S. (2014). Unravelling the complex MRI pattern in glutaric aciduria type I using statistical models-a cohort study in 180 patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37, 763–773.
- Gareri, C., Polimeni, A., Giordano, S., Tammè, L., Curcio, A., & Indolfi, C. (2022). Antisense Oligonucleotides and Small Interfering RNA for the Treatment of Dyslipidemias. *Journal of Clinical Medicine*, 11, 3884.
- Garrod, A. (1902). About Alkaptonuria. *Medico-Chirurgical Transactions*, 85, 69–78.
- Garrod, A. (1909). Garrod's Inborn Errors of Metabolism. *Oxford Medical Publications*.

- Gatrell, S. K., Berg, L. E., Barnard, J. T., Grimmett, J. G., Barnes, K. M., & Blemings, K. P. (2013). Tissue distribution of indices of lysine catabolism in growing swine. *Journal of Animal Science*, 91, 238–247.
- Ghauri, M. S., & Ou, L. (2023). AAV Engineering for Improving Tropism to the Central Nervous System. *Biology*, 12, 186.
- Gicquel, T., Cortial, L., Lutsyk, K., Forget, S., Braun, S., Boyer, P.-O., ... Blin, O. (2023). 2017-2023: state of the art of gene therapies in rare diseases in Europe: the dynamics of clinical R&D, new approved treatments and expected therapies in the pipelines. *Rare Disease and Orphan Drugs*, 2, 23.
- Ginocchio, V. M., & Brunetti-Pierri, N. (2016). Progress toward improved therapies for inborn errors of metabolism. *Human Molecular Genetics*, 25, R27–R35.
- Gong, T., Zhang, C., Ni, X., Li, X., Li, J. 'e, Liu, M., ... Wang, Y. (2020). A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse liver. *Genome Research*, 30, 263–275.
- Gonzalez Melo, M., Fontana, A. O., Viertl, D., Allenbach, G., Prior, J. O., Rotman, S., ... Ballhausen, D. (2021a). A knock-in rat model unravels acute and chronic renal toxicity in glutaric aciduria type I. *Molecular Genetics and Metabolism*, 134, 287–300.
- Gonzalez Melo, M., Remacle, N., Cudré-Cung, H. P., Roux, C., Poms, M., Cudalbu, C., ... Ballhausen, D. (2021b). The first knock-in rat model for glutaric aciduria type I allows further insights into pathophysiology in brain and periphery. *Molecular Genetics and Metabolism*, 133, 157–181.
- Goodman, S. I., Markey, S. P., Moe, P. G., Miles, B. S., & Teng, C. C. (1975). Glutaric aciduria; a “new” disorder of amino acid metabolism. *Biochemical Medicine*, 12, 12–21.
- Goodman, S. I., Norenberg, M. D., Shikes, R. H., Breslich, D. J., & Moe, P. G. (1977). Glutaric aciduria: Biochemical and morphologic considerations. *The Journal of Pediatrics*, 90, 746–750.
- Goodman, S., Kratz, L. E., Digiulio, K. A., Biery, B. J., Goodman, K. E., Isaya, G., & Frerman, F. E. (1995). Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in *Escherichia coli*. *Human Molecular Genetics*, 4, 1493–1498.
- Goodman, S., Stein, D., Schlesinger, S., Christensen, E., Schwartz, M., Greenberg, C., & Elpeleg, O. (1998). Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. *Human Mutation*, 12, 141–144.
- Goodman, S., & Frerman, F. (2001). Organic Acidemias Due to Defects in Lysine Oxidation: 2-Ketoadipic Acidemia and Glutaric Acidemia. *The Metabolic and Molecular Basis of Disease*. McGrawHill (Scriber, pp. 2195–2204).

- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., ... Kay, M. A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441, 537–541.
- Guerreiro, G., Faverzani, J., Jacques, C. E. D., Marchetti, D. P., Sitta, A., de Moura Coelho, D., ... Vargas, C. R. (2018). Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of l-carnitine treatment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 10021–10032.
- Guerreiro, G., Amaral, A. U., Ribeiro, R. T., Faverzani, J., Groehs, A. C., Sitta, A., ... Vargas, C. R. (2019). l-Carnitine prevents oxidative stress in striatum of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1865, 2420–2427.
- Guo, L., Li, Z., Li, Y., Qu, B., Jiao, G., Liang, C., ... Li, W. (2022b). Treatment of glutaric aciduria type I (GA-I) via intracerebroventricular delivery of GCDH. *Fundamental Research*, 2, 836–842.
- Guo, J., Lu, Z.-G., Zhao, R.-C., Li, B.-K., & Zhang, X. (2024). Nucleic acid therapy for metabolic-related diseases. *Chinese Chemical Letters*, 109875.
- Guo, Y., Wu, J., Wang, M., Wang, X., Jian, Y., Yang, C., & Guo, W. (2022). The Metabolite Saccharopine Impairs Neuronal Development by Inhibiting the Neurotrophic Function of Glucose-6-Phosphate Isomerase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 42, 2631–2646.

H

- Hanaford, A. R., Cho, Y. J., & Nakai, H. (2022). AAV-vector based gene therapy for mitochondrial disease: progress and future perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17, 217.
- Harting, I., Neumaier-Probst, E., Seitz, A., Maier, E. M., Assmann, B., Baric, I., ... Kölker, S. (2009). Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. *Brain: A Journal of Neurology*, 132, 1764–1782.
- Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., ... Bosch, F. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 3254–3271.
- Haworth, J., Dilling, L., & Seargeant, L. (1991). Increased prevalence of hereditary metabolic diseases among native Indians in Manitoba and northwestern Ontario. *Canadian Medical Association Journal*, 145, 123–129.
- Healy, L., O'Shea, M., McNulty, J., King, G., Twomey, E., Treacy, E., ... Monavari, A. A. (2022). Glutaric aciduria type 1: Diagnosis, clinical features and long-term outcome in a large cohort of 34 Irish patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 63, 379–387.

- Hedlund, G. L., Longo, N., & Pasquali, M. (2006). Glutaric acidemia type 1. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 142C, 86–94.
- Hinderer, C., Bell, P., Gurda, B. L., Wang, Q., Louboutin, J. P., Zhu, Y., ... Wilson, J. M. (2014). Intrathecal gene therapy corrects CNS pathology in a feline model of mucopolysaccharidosis I. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 22, 2018–2027.
- Hinderer, C., Bell, P., Vite, C. H., Louboutin, J. P., Grant, R., Bote, E., ... Wilson, J. M. (2014). Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 1, 14051.
- Hinderer, C., Katz, N., Buza, E. L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., ... Wilson, J. M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Human Gene Therapy*, 29, 285–298.
- Houten, S. M., Te Brinke, H., Denis, S., Ruiter, J. P. N., Knegt, A. C., De Klerk, J. B. C., ... Duran, M. (2013). Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8.
- Houten, S., & Coughlin, C. R. (2023). Is it time to start to consider treating the liver in glutaric aciduria type 1? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 46, 539–540.
- Hutzler, J., & Dancis, J. (1968). Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 158, 62–69.
- Hyman, D. B., & Tanaka, K. (1984). Specific glutaryl-CoA dehydrogenating activity is deficient in cultured fibroblasts from glutaric aciduria patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 73, 778–784.

I

- Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., & Rizvanov, A. A. (2023). Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells*, 12, 785.

J

- Jafari, P., Braissant, O., Bonafé, L., & Ballhausen, D. (2011). The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, 425–437.
- Jafari, P., Braissant, O., Zavadakova, P., Henry, H., Bonafé, L., & Ballhausen, D. (2013). Ammonium accumulation and cell death in a rat 3D brain cell model of glutaric aciduria type I. *PloS One*, 8, e53735.
- Jagadisan, B., & Dhawan, A. (2023). Hepatotoxicity in Adeno-Associated Viral Vector Gene Therapy. *Current Hepatology Reports*, 22, 276–290.

K

- Kang, L., Jin, S., Wang, J., Lv, Z., Xin, C., Tan, C., ... Liu, J. (2023). AAV vectors applied to the treatment of CNS disorders: Clinical status and challenges. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 355, 458–473.
- Katz, M. L., Tecedor, L., Chen, Y., Williamson, B. G., Lysenko, E., Wininger, F. A., ... Davidson, B. L. (2015). AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Science Translational Medicine*, 7, 313ra180.
- Kavita, U., Sun, K., Braun, M., Lembke, W., Mody, H., Kamerud, J., ... Chemuturi, N. (2023). PK/PD and Bioanalytical Considerations of AAV-Based Gene Therapies: an IQ Consortium Industry Position Paper. *AAPS Journal*, 25, 1–23.
- Keiser, M. S., Kordasiewicz, H. B., & McBride, J. L. (2016). Gene suppression strategies for dominantly inherited neurodegenerative diseases: lessons from Huntington’s disease and spinocerebellar ataxia. *Human Molecular Genetics*, 25, R35–R64.
- Keyser, B., Mühlhausen, C., Dickmanns, A., Christensen, E., Muschol, N., Ullrich, K., & Braulke, T. (2008). Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). *Human Molecular Genetics*, 17, 3854–3863.
- Kiess, A. S., Cleveland, B. M., Wilson, M. E., Klandorf, H., & Blemings, K. P. (2008). Protein-induced alterations in murine hepatic alpha-amino adipate delta-semialdehyde synthase activity are mediated posttranslationally. *Nutrition Research*, 28, 859–865.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 24, 325–340.
- Kimura, S., & Harashima, H. (2020). Current Status and Challenges Associated with CNS-Targeted Gene Delivery across the BBB. *Pharmaceutics*, 12, 1–33.
- Knerr, I., Zschocke, J., Trautmann, U., Dorland, L., De Koning, T. J., Müller, P., ... Hoffman, G. F. (2002). Glutaric aciduria type III: a distinctive non-disease? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 25, 483–490.
- Koeller, D. M., Woontner, M., Crnic, L. S., Kleinschmidt-Demasters, B., Stephens, J., Hunt, E. L., & Goodman, S. I. (2002). Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Human Molecular Genetics*, 11, 347–357.
- Kölker, Stefan, Köhr, G., Ahlemeyer, B., Okun, J. G., Pawlak, V., Hörster, F., ... Hoffmann, G. F. (2002). Ca(2+) and Na(+) dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatric Research*, 52, 199–206.

- Kölker, Stefan, Koeller, D. M., Okun, J. G., & Hoffmann, G. F. (2004). Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Annals of Neurology*, 55, 7–12.
- Kölker, S., Sauer, S. W., Surtees, R. A. H., & Leonard, J. V. (2006). The aetiology of neurological complications of organic acidaemias--a role for the blood-brain barrier. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, 701–704.
- Kölker, Stefan, Christensen, E., Leonard, J. V., Greenberg, C. R., Burlina, A. B., Burlina, A. P., ... Burgard, P. (2007). Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30, 5–22.
- Kölker, Stefan, Garbade, S. F., Boy, N., Maier, E. M., Meissner, T., Mühlhausen, C., ... Hoffmann, G. F. (2007). Decline of acute encephalopathic crises in children with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening in Germany. *Pediatric Research*, 62, 357–363.
- Kölker, Stefan, Christensen, E., Leonard, J. V., Greenberg, C. R., Boneh, A., Burlina, A. B., ... Burgard, P. (2011). Diagnosis and management of glutaric aciduria type I--revised recommendations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34, 677–694.
- Kölker, Stefan, Valayannopoulos, V., Burlina, A. B., Sykut-Cegielska, J., Wijburg, F. A., Teles, E. L., ... Garcia Cazorla, A. (2015). The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38, 1059–1074.
- Komatsuzaki, S., Ediga, R. D., Okun, J. G., Kölker, S., & Sauer, S. W. (2018). Impairment of astrocytic glutaminolysis in glutaric aciduria type I. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41, 91–99.
- Kosuga, M., Enosawa, S., Li, X. K., Suzuki, S., Matsuo, N., Yamada, M., ... Okuyama, T. (2000). Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken beta-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplantation*, 9, 675–680.
- Kotowska-Zimmer, A., Pewinska, M., & Olejniczak, M. (2021). Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 12, e1640.
- Kotterman, M. A., & Schaffer, D. V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 15, 445–451.
- Kumar, S. R., Markusic, D. M., Biswas, M., High, K. A., & Herzog, R. W. (2016). Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 3, 16034.

Kyllerman, M., Skjeldal, O., Christensen, E., Hagberg, G., Holme, E., Lönnquist, T., ... von Döbeln, U. (2004). Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1. *European Journal of Paediatric Neurology*, 8, 121–129.

L

la Marca, G., Carling, R. S., Moat, S. J., Yahyaoui, R., Ranieri, E., Bonham, J. R., & Schielen, P. C. J. I. (2023). Current State and Innovations in Newborn Screening: Continuing to Do Good and Avoid Harm. *International Journal of Neonatal Screening*, 9, 15.

Lam, J., Chow, M., Zhang, Y., & Leung, S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy*, 4, e252.

Lamp, J., Keyser, B., Koeller, D. M., Ullrich, K., Bräulke, T., & Mühlhausen, C. (2011). Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 17777–17784.

Larson, A., & Goodman, S. (2019). *Glutaric Acidemia Type 1*. *GeneReviews [Internet]*. Accés: 27 setembre 2024.

Latini, A., Rodriguez, M., Borba Rosa, R., Scussiato, K., Leipnitz, G., Reis De Assis, D., ... Wajner, M. (2005). 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience*, 135, 111–120.

Latini, Alexandra, Ferreira, G. C., Scussiato, K., Schuck, P. F., Solano, A. F., Dutra-Filho, C. S., ... Wajner, M. (2007). Induction of oxidative stress by chronic and acute glutaric acid administration to rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27, 423–438.

Leandro, J., Dodatko, T., DeVita, R. J., Chen, H., Stauffer, B., Yu, C., & Houten, S. M. (2020). Deletion of 2-aminoadipic semialdehyde synthase limits metabolite accumulation in cell and mouse models for glutaric aciduria type 1. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43, 1154–1164.

Leandro, J., & Houten, S. M. (2020). The lysine degradation pathway: Subcellular compartmentalization and enzyme deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 131, 14–22.

Li, C., & Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 21, 255–272.

Li, Q., Yang, C., Feng, L., Zhao, Y., Su, Y., Liu, H., ... Wang, X. (2021). Glutaric Acidemia, Pathogenesis and Nutritional Therapy. *Frontiers in Nutrition*, 8, 704984.

Ling, Q., Herstine, J. A., Bradbury, A., & Gray, S. J. (2023). AAV-based in vivo gene therapy for neurological disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 22, 789–806.

- Liu, D., Zhu, M., Zhang, Y., & Diao, Y. (2021). Crossing the blood-brain barrier with AAV vectors. *Metabolic Brain Disease*, 36, 45–52.
- Loeber, J. G., Platis, D., Zetterström, R. H., Almashanu, S., Boemer, F., Bonham, J. R., ... Schielen, P. C. J. I. (2021). Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010. *International Journal of Neonatal Screening*, 7, 15.
- Lopez-Gordo, E., Chamberlain, K., Riyad, J. M., Kohlbrenner, E., & Weber, T. (2024). Natural Adeno-Associated Virus Serotypes and Engineered Adeno-Associated Virus Capsid Variants: Tropism Differences and Mechanistic Insights. *Viruses*, 16, 442.
- Lowenstein, P. R. (2009). Crossing the Rubicon. *Nature Biotechnology*, 27, 42.
- Lucas, T. G., Henriques, B. J., Rodrigues, J. V., Bross, P., Gregersen, N., & Gomes, C. M. (2011). Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812, 1658–1663.

M

- Maczuga, P., Koornneef, A., Borel, F., Petry, H., van Deventer, S., Ritsema, T., & Konstantinova, P. (2012). Optimization and comparison of knockdown efficacy between polymerase II expressed shRNA and artificial miRNA targeting luciferase and Apolipoprotein B100. *BMC Biotechnology*, 12, 42.
- Makris, K., Mousa, C., & Cavalier, E. (2023). Alkaline Phosphatases: Biochemistry, Functions, and Measurement. *Calcified Tissue International*, 112, 233–242.
- Manoli, I., & Venditti, C. P. (2016). Disorders of branched chain amino acid metabolism. *Translational Science of Rare Diseases*, 1, 91–110.
- Marchi, P. M., Marrone, L., & Azzouz, M. (2022). Delivery of therapeutic AAV9 vectors via cisterna magna to treat neurological disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 28, 79–80.
- Marinella, G., Pascarella, F., Vetro, A., Bonuccelli, A., Pochiero, F., Santangelo, A., ... Battini, R. (2024). Hyperlysinemia, an ultrarare inborn error of metabolism: Review and update. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, 120, 135–141.
- Martier, R., Liefhebber, J. M., Miniarikova, J., van der Zon, T., Snapper, J., Kolder, I., ... Konstantinova, P. (2019). Artificial MicroRNAs Targeting C9orf72 Can Reduce Accumulation of Intra-nuclear Transcripts in ALS and FTD Patients. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 14, 593–608.
- Märtner, E. M. C., Maier, E. M., Mengler, K., Thimm, E., Schiergens, K. A., Marquardt, T., ... Boy, N. (2021). Impact of interventional and non-interventional variables on anthropometric long-term development in glutaric aciduria type 1: A national prospective multi-centre study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44, 629–638.

- Mateu-Bosch, A., Segur-Bailach, E., García-Villoria, J., Gea-Sorlí, S., Ruiz, I., del Rey, J., ... Fillat, C. (2024a). Modeling Glutaric Aciduria Type I in human neuroblastoma cells recapitulates neuronal damage that can be rescued by gene replacement. *Gene Therapy*, 31, 12–18.
- Mateu-Bosch, Anna, Segur-Bailach, E., Muñoz-Moreno, E., Barallobre, M. J., Arbonés, M. L., Gea-Sorlí, S., ... Fillat, C. (2024b). Systemic delivery of AAV-GCDH ameliorates HLD-induced phenotype in a glutaric aciduria type I mouse model. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 32, 101276.
- Matthews, D. E. (2020). Review of Lysine Metabolism with a Focus on Humans. *The Journal of Nutrition*, 150, 2548S–2555S.
- McBride, J. L., Boudreau, R. L., Harper, S. Q., Staber, P. D., Monteys, A. M., Martins, I., ... Davidson, B. L. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5868–5873.
- McBride, J. L., Pitzer, M. R., Boudreau, R. L., Dufour, B., Hobbs, T., Ojeda, S. R., & Davidson, B. L. (2011). Preclinical safety of RNAi-mediated HTT suppression in the rhesus macaque as a potential therapy for Huntington's disease. *Molecular Therapy*, 19, 2152–2162.
- McCarty, D. M., Young, S. M., & Samulski, R. J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annual Review of Genetics*, 38, 819–845.
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., ... Kaspar, B. K. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*, 377, 1713–1722.
- Mietzsch, M., Broecker, F., Reinhardt, A., Seeberger, P. H., & Heilbronn, R. (2014). Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glycans. *Journal of Virology*, 88, 2991–3003.
- Mills, P. B., Struys, E., Jakobs, C., Plecko, B., Baxter, P., Baumgartner, M., ... Clayton, P. T. (2006). Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nature Medicine*, 12, 307–309.
- Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature Reviews. Genetics*, 12, 341–355.
- Mittermeyer, G., Christine, C. W., Rosenbluth, K. H., Baker, S. L., Starr, P., Larson, P., ... Bankiewicz, K. S. (2012). Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy*, 23, 377.
- Mohammad, S. A., Abdelkhalek, H. S., Ahmed, K. A., & Zaki, O. K. (2015). Glutaric aciduria type 1: neuroimaging features with clinical correlation. *Pediatric Radiology*, 45, 1696–1705.

Morton, D. H., Bennett, M. J., Seargeant, L. E., Nichter, C. A., & Kelley, R. I. (1991). Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania. *American Journal of Medical Genetics*, 41, 89–95.

Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science*, 260, 926–932.

N

Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526, 351–360.

Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 31, 317–334.

Naughten, E. R., Mayne, P. D., Monavari, A. A., Goodman, S. I., Sulaiman, G., & Croke, D. T. (2004). Glutaric aciduria type I: outcome in the Republic of Ireland. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27, 917–920.

Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N. E., ... Kleinschmidt, J. A. (2012). Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein. *Journal of Virology*, 86, 13038–13048.

Naylor, M. C., Negia, M., Noetzel, M., Burns, T. C., Demorest, Z. L., & Low, W. C. (2007). Heparan sulfate mediates neuroprotection from degeneration in experimental glutaric aciduria. *Cell Transplantation*, 16, 187–195.

Nunes, J., Loureiro, S., Carvalho, S., Pais, R. P., Alfaiate, C., Faria, A., ... Diogo, L. (2013). Brain MRI Findings as an Important Diagnostic Clue in Glutaric Aciduria Type 1. *The Neuroradiology Journal*, 26, 155–161.

O

Ogbonmide, T., Rathore, R., Rangrej, S. B., Hutchinson, S., Lewis, M., Ojilere, S., ... Kelly, I. (2023). Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy (SMA): A Review of Current Challenges and Safety Considerations for Onasemnogene Asepavovec (Zolgensma). *Cureus*, 15, e36197.

Olivera-Bravo, S., Fernández, A., Sarlabós, M. N., Rosillo, J. C., Casanova, G., Jiménez, M., & Barbeito, L. (2011). Neonatal Astrocyte Damage Is Sufficient to Trigger Progressive Striatal Degeneration in a Rat Model of Glutaric Acidemia-I. *PLoS One*, 6, e20831.

Olivera-Bravo, S., & Barbeito, L. (2015). A role of astrocytes in mediating postnatal neurodegeneration in Glutaric acidemia-type 1. *FEBS Letters*, 589, 3492–3497.

Olivera-Bravo, S., Ribeiro, C. A. J., Isasi, E., Trías, E., Leipnitz, G., Díaz-amarilla, P., ... Barbeito, L. (2015). Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh^{-/-} mouse model of glutaric acidemia type I. *Human Molecular Genetics*, 24, 4504–4515.

Olivera-Bravo, S., Seminotti, B., Isasi, E., Ribeiro, C. A., Leipnitz, G., Woontner, M., ... Wajner, M. (2019). Long Lasting High Lysine Diet Aggravates White Matter Injury in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh-/-) Mice. *Molecular Neurobiology*, 56, 648–657.

P

Pena, I. A., Marques, L. A., Laranjeira, Â. B. A., Yunes, J. A., Eberlin, M. N., MacKenzie, A., & Arruda, P. (2017). Mouse lysine catabolism to aminoadipate occurs primarily through the saccharopine pathway; implications for pyridoxine dependent epilepsy (PDE). *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863, 121–128.

Pérez-Dueñas, B., García-Cazorla, A., Pineda, M., Poo, P., Campistol, J., Cusí, V., ... Vilaseca, M. A. (2009). Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *European Journal of Paediatric Neurology*, 13, 444–451.

Pfister, E. L., Chase, K. O., Sun, H., Kennington, L. A., Conroy, F., Johnson, E., ... Mueller, C. (2017). Safe and Efficient Silencing with a Pol II, but Not a Pol III, Promoter Expressing an Artificial miRNA Targeting Human Huntingtin. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 7, 324–334.

Pierson, T. M., Nezhad, M., Tremblay, M. A., Lewis, R., Wong, D., Salamon, N., & Sicotte, N. (2015). Adult-onset glutaric aciduria type I presenting with white matter abnormalities and subependymal nodules. *Neurogenetics*, 16, 325–328.

Piguet, F., Alves, S., & Cartier, N. (2017). Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Human Gene Therapy*, 28, 988–1003.

Posset, R., Opp, S., Struys, E. A., Völkl, A., Mohr, H., Hoffmann, G. F., ... Okun, J. G. (2015). Understanding cerebral L-lysine metabolism: the role of L-pipecolate metabolism in Gcdh-deficient mice as a model for glutaric aciduria type I. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38, 265–272.

Przyrembel, H., Bachmann, D., Lombeck, I., Becker, K., Wendel, U., Wadman, S. K., & Bremer, H. J. (1975). Alpha-ketoadipic aciduria, a new inborn error of lysine metabolism; biochemical studies. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry*, 58, 257–269.

Pupo, A., Fernández, A., Low, S. H., François, A., Suárez-Amarán, L., & Samulski, R. J. (2022). AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 30, 3515–3541.

R

Ribeiro, J. V., Gomes, C. M., & Henriques, B. J. (2020). Functional Recovery of a GCDH Variant Associated to Severe Deflavinylation—Molecular Insights into Potential Beneficial Effects of Riboflavin Supplementation in Glutaric Aciduria-Type I Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–16.

- Ristoff, E., Hebert, C., Njålsson, R., Norgren, S., Rooyackers, O., & Larsson, A. (2002). Glutathione synthetase deficiency: is gamma-glutamylcysteine accumulation a way to cope with oxidative stress in cells with insufficient levels of glutathione? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 25, 577–584.
- Robinson, R. (2004). RNAi therapeutics: how likely, how soon? *PLoS Biology*, 2, E28.
- Rodrigues, M. D. N., Seminotti, B., Amaral, A. U., Leipnitz, G., Goodman, S. I., Woontner, M., ... Wajner, M. (2015). Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A potential role for glutamatergic-induced excitotoxicity in GA I neuropathology. *Journal of the Neurological Sciences*, 359, 133–140.
- Rodrigues, M. D. N., Seminotti, B., Zanatta, Â., de Mello Gonçalves, A., Bellaver, B., Amaral, A. U., ... Wajner, M. (2017). Higher Vulnerability of Menadione-Exposed Cortical Astrocytes of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient Mice to Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Cell Death: Implications for the Neurodegeneration in Glutaric Aciduria Type I. *Molecular Neurobiology*, 54, 4795–4805.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., ... Anderson, W. F. (1990). Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New England Journal of Medicine*, 323, 570–578.

S

- Samaranch, L., Salegio, E. A., San Sebastian, W., Kells, A. P., Foust, K. D., Bringas, J. R., ... Bankiewicz, K. S. (2012). Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Human Gene Therapy*, 23, 382–389.
- Samulski, R. J., Berns, K. I., Tan, M., & Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2077–2081.
- Samulski, R. J., Chang, L. S., & Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *Journal of Virology*, 61, 3096–3101.
- Samulski, R. J., & Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annual Review of Virology*, 1, 427–451.
- Sardone, V., Zhou, H., Muntoni, F., Ferlini, A., & Falzarano, M. S. (2017). Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease. *Molecules*, 22, 563.

- Saudubray, J. M., & Garcia-Cazorla, À. (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatric Clinics of North America*, 65, 179–208.
- Sauer, S. W., Okun, J. G., Fricker, G., Mahringer, A., Müller, I., Crnic, L. R., ... Kölker, S. (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Neurochemistry*, 97, 899–910.
- Sauer, S. W., Opp, S., Hoffmann, G. F., Koeller, D. M., Okun, J. G., & Kölker, S. (2011). Therapeutic modulation of cerebral L-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain: A Journal of Neurology*, 134, 157–170.
- Sauer, S. W., Opp, S., Komatsuzaki, S., Blank, A. E., Mittelbronn, M., Burgard, P., ... Kölker, S. (2015). Multifactorial modulation of susceptibility to l-lysine in an animal model of glutaric aciduria type I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852, 768–777.
- Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., ... Bharani, K. K. (2022). Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sciences*, 294, 120375.
- Schmiesing, J., Lohmöller, B., Schweizer, M., Tidow, H., Gersting, S. W., Muntau, A. C., ... Mühlhausen, C. (2017). Disease-causing mutations affecting surface residues of mitochondrial glutaryl-CoA dehydrogenase impair stability, heteromeric complex formation and mitochondria architecture. *Human Molecular Genetics*, 26, 538–551.
- Schuster, D. J., Dykstra, J. A., Riedl, M. S., Kitto, K. F., Belur, L. R., Scott McIvor, R., ... Vulchanova, L. (2014). Biodistribution of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) vector after intrathecal and intravenous delivery in mouse. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 42.
- Schuurmans, I. M. E., Dimitrov, B., Schröter, J., Ribes, A., de la Fuente, R. P., Zamora, B., ... Garanto, A. (2023). Exploring genotype-phenotype correlations in glutaric aciduria type 1. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 46, 371–390.
- Schuurmans, I. M. E., van Karnebeek, C. D. M., Hoogendoorn, A. D. M., Ribes, A., Nadif Kasri, N., & Garanto, A. (2024). Generation of hiPSC lines from four glutaric aciduria type I (GA1) patients carrying pathogenic biallelic variants in GCDH. *Stem Cell Research*, 79, 103481.
- Seminotti, B., da Rosa, M. S., Fernandes, C. G., Amaral, A. U., Braga, L. M., Leipnitz, G., ... Wajner, M. (2012). Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106, 31–38.

- Seminotti, B., Amaral, A. U., da Rosa, M. S., Fernandes, C. G., Leipnitz, G., Olivera-Bravo, S., ... Wajner, M. (2013). Disruption of brain redox homeostasis in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice treated with high dietary lysine supplementation. *Molecular Genetics and Metabolism*, 108, 30–39.
- Seminotti, B., Amaral, A. U., Ribeiro, R. T., Rodrigues, M. D. N., Colín-González, A. L., Leipnitz, G., ... Wajner, M. (2016). Oxidative Stress, Disrupted Energy Metabolism, and Altered Signaling Pathways in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Knockout Mice: Potential Implications of Quinolinic Acid Toxicity in the Neuropathology of Glutaric Acidemia Type I. *Molecular Neurobiology*, 53, 6459–6475.
- Seminotti, B., Amaral, A. U., Grings, M., Ribeiro, C. A. J., Leipnitz, G., & Wajner, M. (2020). Lipopolysaccharide-Elicited Systemic Inflammation Induces Selective Vulnerability of Cerebral Cortex and Striatum of Developing Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh-/-) Mice to Oxidative Stress. *Neurotoxicity Research*, 38, 1024–1036.
- Seminotti, B., Brondani, M., Ribeiro, R. T., Leipnitz, G., & Wajner, M. (2022). Disturbance of Mitochondrial Dynamics, Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Crosstalk, Redox Homeostasis, and Inflammatory Response in the Brain of Glutaryl-CoA Dehydrogenase-Deficient Mice: Neuroprotective Effects of Bezafibrate. *Molecular Neurobiology*, 59, 4839–4853.
- Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. ping. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18, 421–446.
- Seyhan, A. A. (2024). Trials and Tribulations of MicroRNA Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 1469.
- Sharma, V. K., & Watts, J. K. (2015). Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress. *Future Medicinal Chemistry*, 7, 2221–2242.
- Shay, T. F., Sullivan, E. E., Ding, X., Chen, X., Kumar, S. R., Goertsen, D., ... Gradinaru, V. (2023). Primate-conserved carbonic anhydrase IV and murine-restricted LY6C1 enable blood-brain barrier crossing by engineered viral vectors. *Science Advances*, 9, eadg6618.
- Sherman, E. A., Strauss, K. A., Tortorelli, S., Bennett, M. J., Knerr, I., Morton, D. H., & Puffenberger, E. G. (2008). Genetic mapping of glutaric aciduria, type 3, to chromosome 7 and identification of mutations in c7orf10. *American Journal of Human Genetics*, 83, 604–609.
- Słyk, Ź., Stachowiak, N., & Małecki, M. (2024). Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors for Gene Therapy of the Central Nervous System: Delivery Routes and Clinical Aspects. *Biomedicines*, 12, 1523.

- Soffer, D., Amir, N., Elpeleg, O. N., Gomori, J. M., Shalev, R. S., & Gottschalk-Sabag, S. (1992). Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric acidemia. *Journal of the Neurological Sciences*, 107, 199–204.
- Sparmann, A., & Vogel, J. (2023). RNA -based medicine: from molecular mechanisms to therapy. *The EMBO Journal*, 42, e114760.
- Srivastava, A. (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Current Opinion in Virology*, 21, 75–80.
- Stanton, A. C., Lagerborg, K. A., Tellez, L., Krunnusz, A., King, E. M., Ye, S., ... Sabeti, P. C. (2023). Systemic administration of novel engineered AAV capsids facilitates enhanced transgene expression in the macaque CNS. *Med (New York, N.Y.)*, 4, 31-50.e8.
- Stiles, A. R., Venturoni, L., Mucci, G., Elbalalesy, N., Woontner, M., Goodman, S., & Abdenur, J. E. (2016). New Cases of DHTKD1 Mutations in Patients with 2-Ketoadipic Aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 25, 15–19.
- Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Robinson, D. L., & Morton, D. H. (2003). Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 121C, 38–52.
- Strauss, K. A., Williams, K. B., Carson, V. J., Poskitt, L., Bowser, L. E., Young, M., ... Morton, D. H. (2020). Glutaric acidemia type 1: Treatment and outcome of 168 patients over three decades. *Molecular Genetics and Metabolism*, 131, 325–340.
- Sun, K., & Liao, M. Z. (2022). Clinical Pharmacology Considerations on Recombinant Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy. *Journal of Clinical Pharmacology*, 62, S79–S94.

T

- Taghian, T., Marosfoi, M. G., Puri, A. S., Cataltepe, O. I., King, R. M., Diffie, E. B., ... Gray-Edwards, H. L. (2020). A Safe and Reliable Technique for CNS Delivery of AAV Vectors in the Cisterna Magna. *Molecular Therapy*, 28, 411–421.
- Therrell, B. L., Lloyd-Puryear, M. A., Camp, K. M., & Mann, M. Y. (2014). Inborn errors of metabolism identified via newborn screening: Ten-year incidence data and costs of nutritional interventions for research agenda planning. *Molecular Genetics and Metabolism*, 113, 14–26.
- Thies, B., Meyer-Schwesinger, C., Lamp, J., Schweizer, M., Koeller, D. M., Ullrich, K., ... Mühlhausen, C. (2013). Acute renal proximal tubule alterations during induced metabolic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832, 1463–1472.

Thirtamara Rajamani, K., Leithead, A. B., Kim, M., Barbier, M., Peruggia, M., Niblo, K., ... Harony-Nicolas, H. (2021). Efficiency of cell-type specific and generic promoters in transducing oxytocin neurons and monitoring their neural activity during lactation. *Scientific Reports*, 11, 1–14.

Tian, F., Fu, X., Gao, J., Ying, Y., Hou, L., Liang, Y., ... Luo, X. (2014). Glutaric acid-mediated apoptosis in primary striatal neurons. *BioMed Research International*, 2014, 484731.

Traber, G. M., & Yu, A. M. (2023). RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 384, 133–154.

V

Vaidyanathan, K., Narayanan, M. P., & Vasudevan, D. M. (2011). Organic Acidurias: An Updated Review. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26, 319.

Valdmanis, P. N., & Kay, M. A. (2017). Future of rAAV Gene Therapy: Platform for RNAi, Gene Editing, and Beyond. *Human Gene Therapy*, 28, 361–372.

van der Watt, G., Owen, E. P., Berman, P., Meldau, S., Watermeyer, N., Olpin, S. E., ... Henderson, H. (2010). Glutaric aciduria type 1 in South Africa-high incidence of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in black South Africans. *Molecular Genetics and Metabolism*, 101, 178–182.

van Karnebeek, C. D. M., Bowden, K., & Berry-Kravis, E. (2016). Treatment of Neurogenetic Developmental Conditions: From 2016 into the Future. *Pediatric Neurology*, 65, 1–13.

Vendramin Pasquetti, M., Meier, L., Loureiro, S., Ganzella, M., Junges, B., Barbieri Caus, L., ... Calcagnotto, M. E. (2017). Impairment of GABAergic system contributes to epileptogenesis in glutaric acidemia type I. *Epilepsia*, 58, 1771–1781.

Vernon, H. J. (2015). Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatrics*, 169, 778–782.

Vester, M. E. M., Visser, G., Wijburg, F. A., van Spronsen, F. J., Williams, M., & van Rijn, R. R. (2016). Occurrence of subdural hematomas in Dutch glutaric aciduria type 1 patients. *European Journal of Pediatrics*, 175, 1001–1006.

W

Wajner, M., Amaral, A. U., Leipnitz, G., & Seminotti, B. (2019). Pathogenesis of brain damage in glutaric acidemia type I: Lessons from the genetic mice model. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 78, 215–221.

Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18, 358–378.

- Wang, J. H., Gessler, D. J., Zhan, W., Gallagher, T. L., & Gao, G. (2024). Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9, 78.
- Watanabe, C., Cuellar, T. L., & Haley, B. (2016). Quantitative evaluation of first, second, and third generation hairpin systems reveals the limit of mammalian vector-based RNAi. *RNA Biology*, 13, 25–33.
- Waters, P. J., Kitzler, T. M., Feigenbaum, A., Geraghty, M. T., Al-Dirbashi, O., Bherer, P., ... Al-Hertani, W. (2018). Glutaric Aciduria Type 3: Three Unrelated Canadian Cases, with Different Routes of Ascertainment. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 39, 89–96.
- Weatherall, D. J. (2008). The centenary of Garrod's Croonian lectures. *Clinical Medicine*, 8, 309–311.
- Woolf, L. I., & Adams, J. (2020). The Early History of PKU. *International Journal of Neonatal Screening*, 6, 59.
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1, 8, 1–27.

X

- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., & Chapman, M. S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10405–10410.
- Xu, L., Daly, T., Gao, C., Flotte, T. R., Song, S., Byrne, B. J., ... Ponder, K. P. (2001). CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Human Gene Therapy*, 12, 563–573.
- Xu, W., Jiang, X., & Huang, L. (2019). RNA Interference Technology. *Comprehensive Biotechnology*, 560-575.

Y

- Yuan, Y., Dimitrov, B., Boy, N., Gleich, F., Zielonka, M., & Kölker, S. (2023). Phenotypic prediction in glutaric aciduria type 1 combining in silico and in vitro modeling with real-world data. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 46, 391–405.

Z

- Zamecnik, P. C., & Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 280–284.
- Zhang, R., Liu, Y., Yu, F., Xu, G., Li, L., Li, B., & Lou, Z. (2024). Structural basis of the recognition of adeno-associated virus by the neurological system-related receptor carbonic anhydrase IV. *PLoS Pathogens*, 20, e1011953.
- Zhou, J., Wang, X., Wang, M., Chang, Y., Zhang, F., Ban, Z., ... Yang, C. (2019). The lysine catabolite saccharopine impairs development by disrupting mitochondrial homeostasis. *The Journal of Cell Biology*, 218, 580–597.
- Zhou, X., Liu, J., Xiao, S., Liang, X., Li, Y., Mo, F., ... Gao, C. (2024). Adeno-Associated Virus Engineering and Load Strategy for Tropism Modification, Immune Evasion and Enhanced Transgene Expression. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 19, 7691–7708.
- Zinnanti, W. J., Lazovic, J., Wolpert, E. B., Antonetti, D. A., Smith, M. B., Connor, J. R., ... Cheng, K. C. (2006). A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain: A Journal of Neurology*, 129, 899–910.
- Zinnanti, W. J., Lazovic, J., Housman, C., Lanoue, K., O'Callaghan, J. P., Simpson, I., ... Cheng, K. C. (2007). Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 3258–3270.
- Zinnanti, W. J., & Lazovic, J. (2010). Mouse model of encephalopathy and novel treatment strategies with substrate competition in glutaric aciduria type I. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100, S88–91.
- Zong, W., Liu, S., Wang, X., Zhang, J., Zhang, T., Liu, Z., ... Gao, J. (2015). Trio gene is required for mouse learning ability. *Brain Research*, 1608, 82–90.

8.ANNEX

8.1. Taules

Taula 8.1. Recopilació dels encebadors utilitzats

Experiment	Nom encebador	Seqüència (5' → 3')
PCR Validació generació p_AAV_miR_AASS	Fwd_miR_AASS	CAACGTGCTGGTTATTGTGCT
	Rev_miR_AASS	ACGAAGTAATTCTTTGCACCATTCT
PCR Validació generació psiCHECK2_AASS	Fwd_Check2	ACATCAAGAGCTTCGTGGAG
	Rev_Check2	CAGACAAACCCTAACCACCG
qPCR Expressió AASS Humà	Fwd_AASS_H	GGCTTCTTGGTGGCAAAACAGG
	Rev_AASS_H	GCTGGTGTGATGTAGCTTGCAG
	Fwd_HPRT_H	GATATAAGCCAGACTTTGTTGGATTG
	Rev_HPRT_H	CTTGAACCTCTCATCTTAGGCTTTG
qPCR Expressió Aass Ratolí	Fwd_Aass_R	AAAGCTGCAATCCCTGGTGG
	Rev_Aass_R	GCTTTTCGATGCAGGCTTTGG
	Fwd_Hprt_R	CTCATGGACTGATTATGGACAGGA
	Rev_Hprt_R	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
qPCR sonda TaqMan Expressió miRNA madur	Fwd miR_AASS madur	AAGACCAGGGTCTAATCCCAAC
	Rev miR_AASS madur	AAGACCAGGGUCUAAUCCCAAC

Taula 8.2. Seqüències miR_AASS per a la generació dels pmiR_AASS

Nom	Seqüència (5' → 3')
seqüència	
miR_1	<i>GAAGTAATAGATCTATGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAA</i> <i>TACAAGGATCTGATCTTCTGAAGAAAATATATTTCTTTTATTTCATAGCTC</i> <i>TTATGATAGCAATGTCAGCAGTGCCTTTTCCAGGTGAGAGGGTTGGCCTTA</i> <i>AGATTCTAAAATTATGGCCAACCCTCTCGCCTGGAAAAAGTAAGGTTGACC</i> <i>ATACTCTACAGTTGTGTTTTAATGTATATTAATGTTACTAATGTGTTTTCA</i> <i>GTTTTATTGATAGTCTTTTCAGTATTATTGAGCTTGATATCGTCTG</i>
miR_2	<i>GAAGTAATAGATCTATGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAA</i> <i>TACAAGGATCTGATCTTCTGAAGAAAATATATTTCTTTTATTTCATAGCTC</i> <i>TTATGATAGCAATGTCAGCAGTGCCTAGGGCCCCATTAGGCCTTTGGCTTA</i> <i>AGATTCTAAAATTATGCCAAAGGCCTAAGGGGGCCCTAAGTAAGGTTGACC</i> <i>ATACTCTACAGTTGTGTTTTAATGTATATTAATGTTACTAATGTGTTTTCA</i> <i>GTTTTATTGATAGTCTTTTCAGTATTATTGAGCTTGATATCGTCTG</i>
miR_3	<i>GAAGTAATAGATCTATGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAA</i> <i>TACAAGGATCTGATCTTCTGAAGAAAATATATTTCTTTTATTTCATAGCTC</i> <i>TTATGATAGCAATGTCAGCAGTGCCTAACAAGCTGATCACAAAGATCCTTTA</i> <i>AGATTCTAAAATTATAGGATCTTGTGATTAGCTTGTTAAGTAAGGTTGACC</i> <i>ATACTCTACAGTTGTGTTTTAATGTATATTAATGTTACTAATGTGTTTTCA</i> <i>GTTTTATTGATAGTCTTTTCAGTATTATTGAGCTTGATATCGTCTG</i>
miR_4	<i>GAAGTAATAGATCTATGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAA</i> <i>TACAAGGATCTGATCTTCTGAAGAAAATATATTTCTTTTATTTCATAGCTC</i> <i>TTATGATAGCAATGTCAGCAGTGCCTAAGACCAGGGTCTAATCCCAACTTA</i> <i>AGATTCTAAAATTATGTGGGGATTAGACTCTGGTCTTAAGTAAGGTTGACC</i> <i>ATACTCTACAGTTGTGTTTTAATGTATATTAATGTTACTAATGTGTTTTCA</i> <i>GTTTTATTGATAGTCTTTTCAGTATTATTGAGCTTGATATCGTCTG</i>
miR_4-Sc	<i>GAAGTAATAGATCTATGAAAAGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAA</i> <i>TACAAGGATCTGATCTTCTGAAGAAAATATATTTCTTTTATTTCATAGCTC</i> <i>TTATGATAGCAATGTCAGCAGTGCCTGAAGAACCACGTCCTAGAACCTTTA</i> <i>AGATTCTAAAATTATAGGTTCTAGGACGGGGTTCTTCAAGTAAGGTTGACC</i> <i>ATACTCTACAGTTGTGTTTTAATGTATATTAATGTTACTAATGTGTTTTCA</i> <i>GTTTTATTGATAGTCTTTTCAGTATTATTGAGCTTGATATCGTCTG</i>

En cursiva es mostren les regions d'homologia amb el plasmidi linealitzat p_AAV_CA (Adgene – ref. 69616). En gris es mostren els 100pb del pri-miR-16 humà endogen que flanquegen la seqüència pri_miR_AASS. En vermell es mostra la cadena guia. En blau es mostra la seqüència que forma el *loop*, que pertany al pri-miR-16 humà. En taronja es mostra la cadena passatgera.

Taula 8.3. Seqüències AASS_Humà i Aass_Ratolí per a la generació dels psiCHECK2_AASS.

Nom	Seqüència (5' → 3')
seqüència	
AASS_Humà	<i>TAGGCGATCGCTCGACTACATAAGTCGTTTTAATACTGATATTGCACCCTAT</i> <i>ACAACCTTGCTTAATTAATGGAATGGCTTCTTGGTGGCAAAACAGGATCTTG</i> <i>TCATCAGCTTGTTGCCTTATGTATTGCACCCTGGTGAATTGGGATTGGACCC</i> <i>TGGTCTGGATCACATGTTAGCAATGGAAACAATAGATAAAAGCGCTTCCTGC</i> <i>CTTTAGACCTGAGGCCAACCCTCTCACCTGGAAACAACCTCCTCTGTGAGCAGC</i> <i>CAAAATGTTGCTTGATGGTGAATTTGGAGCCAAAGGCCTAATGGGGCCCTTT</i> <i>TCAAAGGAGATCTATGGACCAATATTGGAGCGAATTAAAGCAGAAGGCATTA</i> <i>TATATACTACAGGCCGCTGGCCGCAA</i>
Aass_Ratolí	<i>TAGGCGATCGCTCGACTACACAAGTCGTTTTAATACAGATATTGCGCCCTAT</i> <i>ACAACCTTGTTTAATTAATGGAATCTACTGGGAGCAAAACAATCCCTGGTGGA</i> <i>ATCCCAGGATCTTGATGATCAGCTTGTTGCCTTATGTGCTTCATCCTGATGCTG</i> <i>GCATTACAGTCATTGGTGAGTTGGGATTAGACCCTGGTCTTGATCACATGTT</i> <i>TCCGACCTGAGGCCAACCCTCTCACCTGGAAACAACCTCCTATGTGACCTAGTT</i> <i>GGAATTTCCCGCTGTTGCTTGATGGTGAATTTGAAGCCAAAGGCCTAATGGG</i> <i>GCCCTTTACAAAGGAGATCTATGGGCCAATATTGGAGCGGATTAAAGCAGAAG</i> <i>GCATTGTAGGCCGCTGGCCGCAA</i>

*En cursiva es mostren les regions d'homologia amb el plasmidi linealitzat psiCHECK2_AASS (Promega – ref. C8021).

8.2. Articles

Articles científics relacionats amb la tesi doctoral amb contribució de la doctoranda:

1. *Modeling Glutaric Aciduria Type I in human neuroblastoma cells recapitulates neuronal damage that can be rescued by gene replacement mouse model.*

Autors: Mateu-Bosch A*, Segur-Bailach E*, García-Villoria J, Gea-Sorlí S, Ruiz I, Del Rey J, Camps J, Guitart-Mampel M, Garrabou G, Tort F, Ribes A, Fillat C. *Igual contribució.

Revista: Gene Therapy. 2024 Jan; 31(1-2):12-18. DOI: 10.1038/s41434-023-00428-8.

2. *Systemic delivery of AAV-GCDH ameliorates HLD-induced phenotype in a glutaric aciduria type I mouse model.*

Autors: Mateu-Bosch A*, Segur-Bailach E*, Muñoz-Moreno E, Barallobre MJ, Arbonés ML, Gea-Sorlí S, Tort F, Ribes A, García-Villoria J, Fillat C. *Igual contribució.

Revista: Molecular Therapy Methods & Clinical Development. 2024 Jun; 32(3):101276. DOI: 10.1016/j.omtm.2024.101276.

BRIEF COMMUNICATION



Modeling Glutaric Aciduria Type I in human neuroblastoma cells recapitulates neuronal damage that can be rescued by gene replacement

A. Mateu-Bosch^{1,2,8}, E. Segur-Bailach^{1,2,3,8}, J. García-Villoria^{1,3,4,5}, S. Gea-Sorlí^{1,3}, I. Ruiz⁶, J. del Rey⁶, J. Camps^{1,6,7}, M. Guitart-Mampel^{1,2,3,5}, G. Garrabou^{1,2,3,5}, F. Tort^{1,3,5}, A. Ribes^{1,3,5} and C. Fillat^{1,2,3}

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2023

Glutaric Aciduria type I (GA1) is a rare neurometabolic disorder caused by mutations in the *GCDH* gene encoding for glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH) in the catabolic pathway of lysine, hydroxylysine and tryptophan. GCDH deficiency leads to increased concentrations of glutaric acid (GA) and 3-hydroxyglutaric acid (3-OHGA) in body fluids and tissues. These metabolites are the main triggers of brain damage. Mechanistic studies supporting neurotoxicity in mouse models have been conducted. However, the different vulnerability to some stressors between mouse and human brain cells reveals the need to have a reliable human neuronal model to study GA1 pathogenesis. In the present work we generated a *GCDH* knockout (KO) in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y by CRISPR/Cas9 technology. SH-SY5Y-*GCDH* KO cells accumulate GA, 3-OHGA, and glutarylcarnitine when exposed to lysine overload. GA or lysine treatment triggered neuronal damage in GCDH deficient cells. SH-SY5Y-*GCDH* KO cells also displayed features of GA1 pathogenesis such as increased oxidative stress vulnerability. Restoration of the GCDH activity by gene replacement rescued neuronal alterations. Thus, our findings provide a human neuronal cellular model of GA1 to study this disease and show the potential of gene therapy to rescue GCDH deficiency.

Gene Therapy (2024) 31:12–18; <https://doi.org/10.1038/s41434-023-00428-8>

INTRODUCTION

Glutaric aciduria type I (GA1, OMIM #231670) is an autosomal recessive disorder of lysine (Lys), hydroxylysine and tryptophan catabolism, due to the deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH, EC 1.3.99.7). GCDH is a homotetrameric mitochondrial flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme, that catalyzes the oxidative decarboxylation of glutaryl-CoA to crotonyl-CoA and CO₂. Mutations in this gene cause a deficiency of GCDH that leads to the accumulation of glutaric (GA) and 3-hydroxyglutaric (3-OHGA) acids, as well as glutarylcarnitine (C5DC) and to a depletion of carnitine in tissues and body fluids. It was described for the first time in 1975 by Goodman and colleagues [1]. Since then, more than 200 mutations have been reported in the Human Gene Mutation Database (HGMD; www.hgmd.cf.ac.uk) and have been recently reviewed in Schuurmans et al. 2023 [2]. Genotype-phenotype correlation has not always been verified, but interestingly, an in silico model has recently shown to predict high pathogenicity in the genotypes causing low enzyme activity [3]. The estimated prevalence of the disease is about 1:100,000 in Caucasians. Clinically, GCDH deficiency is characterized by acute degeneration of the caudate

and putamen, severe dystonic-dyskinetic disorder, hypotonia and irritability that generally occurs between 3 and 36 months of age during encephalopathic crises precipitated by febrile illnesses, surgical processes or even routine vaccinations [4–9], but a relevant number of patients have symptoms such as macrocephaly and delayed motor development during the first weeks of life. The majority (90–95%) of untreated individuals develop irreversible striatal damage and, subsequently, a complex movement disorder with predominant dystonia [5, 10].

GA1 knockout (KO) mouse model with complete loss of GCDH (*Gcdh*−/−) presents similar biochemical abnormalities to those found in patients [11]. However, these KO mice did not show relevant neurologic symptoms unless they were fed with high Lys diet [11–13]. Elevated levels of GA and 3-OHGA in the brain have been proposed as the main triggers of neuronal toxicity [14, 15]. Excitotoxicity, disruption of energy metabolism and redox homeostasis, oxidative stress, and alteration of the glutamatergic and GABAergic systems, as well as blood–brain barrier breakdown in the cerebral cortex and striatum of *Gcdh*−/− mice exposed to a high protein or Lys diet have been proposed as pathogenic processes [9, 12, 13, 15]. However, the cellular mechanisms

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ²Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain. ⁴Section of Inborn Errors of Metabolism-IBC, Biochemical and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Inherited Metabolic Diseases and Muscle Disorders' Research Group, Barcelona, Spain. ⁶Unitat de Biologia Cel·lular i

Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain. ⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain. ⁸These authors contributed equally: A. Mateu-Bosch, E. Segur-Bailach.

[✉]email: cfillat@recercaclinic.cat

Received: 12 May 2023 Revised: 26 October 2023 Accepted: 7 November 2023

Published online: 20 November 2023

leading to neuronal damage in GA1 remains unclear. Until now most of the studies have been conducted in tissues and cells derived from mouse or rat models but a human neuronal model to interrogate GA1 condition is lacking. The SH-SY5Y cells are human neuroblastoma cells, which are comparable to neurons with regards to their morphological, neurochemical and electrophysiological properties and have been extensively used to evaluate neuronal injury or mitochondrial dysfunction in brain pathology [14, 16].

In the present work, we generated and characterized an SH-SY5Y human neuronal cell model of GCDH deficiency by using CRISPR-Cas9 technology to develop *GCDH* KO cells. We also explored the potential of restoring GCDH defects through gene replacement. We observed that high Lys exposure of *GCDH* KO cells resulted in the accumulation of neurotoxic metabolites and triggered alterations in the mitochondrial redox homeostasis, recapitulating the disease phenotype. Delivery of the *GCDH* cDNA under the human 3-phosphoglycerate kinase (PGK) promoter restored GCDH activity and prevented from the cellular damage. In addition, the generated model could be appropriate to perform molecular studies to improve understanding of the physiopathology of the disease as well as to test potential therapies for GA1.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

pLentiCRISPRv2_ *GCDH*: CRISPR guides that target *GCDH* were selected using the CRISPR guide selection software from Feng Zhang's laboratory (<https://zlab.bio/guide-design-resources>). Guides (sgRNA1: CTCGCTCTGAGAGCATGG; sgRNA2: CGGGAGAACACAGAGCCAAC; sgRNA3: CCACTCAAACGCGGACGCG) targeting exons 3 and 4 of the *GCDH* gene were cloned into the pLentiCRISPR v2 plasmid (Addgene #52961, Watertown, MA, USA) containing SpCas9 and puromycin genes, following manufacturer's protocol. For gene editing experiments, we used plasmids: pLentiCRISPR v2 (Addgene #52961) and the dsDNA donor. Oligos were annealed and subsequently cloned into the pLentiCRISPR v2 plasmid, followed by Sanger sequencing, according to manufacturer's protocol.

pEGFP/PGK-*GCDH*: The construct was generated using elements from the pCCL.PGK.FANCA.WPRE backbone [17]. This plasmid contains the EGFP gene that will be expressed upon integration allowing for the FACS sorting of gene-targeted cells. The FANCA gene from the pCCL.PGK.FANCA plasmid was removed and substituted by the *GCDH* gene (p*GCDH* from PlasmID Repository, Boston, MA, USA) to generate pEGFP/PGK-*GCDH*. In this construct, the *GCDH* gene is under the transcriptional control of the human PGK promoter.

Cell lines and cellular models

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM/F12 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 µg/mL), and streptomycin (100 µg/mL) (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA), and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells to neuronal cultures was performed on an 18 days period in the presence of retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) following the protocol described by Shipley and collaborators [18].

SH-SY5Y-*GCDH*-KO cells were generated by CRISPR/Cas9 technology. pLentiCRISPRv2_ *GCDH* was electroporated into SH-SY5Y cells with the Neon[®] Transfection System MPK5000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Electroporation conditions followed voltage, pulse and time parameters suggested by the Neon website for SH-SY5Y. Cells were exposed to 2 weeks of puromycin selection (2.5 µg/ml) and plated as single cells. Individual clones were tested by western blot for loss of GCDH expression and genetic alterations at the *GCDH* gene were confirmed by Sanger sequencing.

SH-SY5Y-*GCDH*-GI cells were generated by nucleofection. For this, the SH-SY5Y-*GCDH*-KO1 clone cells were nucleofected by Neon[®] Transfection System MPK5000 (Invitrogen) with the pEGFP/PGK-*GCDH* cassette. One week later, cells expressing EGFP were selected by FACS sorting in a FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and expanded. The expression of GCDH was tested by western blot.

Cell counting assay

Hochst 33342 (H3570, Invitrogen) was added to cells at a final concentration of 1 µg/mL for 30 min at 37 °C. Fluorescence intensity was measured in a plate reader (Tecan M200 Pro, Männedorf, Switzerland). Excitation and emission wavelengths were 361 nm and 486 nm.

Apoptosis detection by flow cytometry

Apoptosis was quantified by double-staining with annexin V conjugated to fluorescein isothiocyanate and propidium iodide (88–8005–74, Invitrogen). Ten thousand cells per sample were acquired in BD FACS CANTOTM II and the proportions of labeled cells were analyzed using FlowJo v10 Software (Asland, OR, USA).

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE)

Cell pellets were resuspended in Mannitol buffer (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA) and Dounce homogenized (20 strokes) on ice. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation twice at 650 g for 20 min at 4 °C. After determining the protein concentration with a BCA assay, mitochondria-enriched pellets were obtained from the volume equivalent to 600 µg of protein, as described previously [19]. Samples were loaded in a 4% to 20% polyacrylamide gradient gels and electrophoresed in non-denaturing conditions. GCDH in gel activity was performed by incubating the gel in an activity buffer (50 mM Phosphate buffer, 200 µM Glutaryl CoA, 1.5 µM FAD and 2 mg/ml NBT) at 37 °C O/N.

Metabolite analysis

Cell extracts were obtained as described above. Then, protein precipitation and C5DC extraction were performed with organic solvent containing C5DC-d5 used as internal standard (NeoBase 1 kit, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). After centrifugation, the supernatant was dried under nitrogen and derivatized with n-butanol/HCl 3N, dried again, and finally reconstituted in methanol/H₂O (75/25). The analysis was performed in a ACQUITY UPLC system-Class-XevoTQD tandem mass spectrometry (Waters, Beverly, MA, USA) by direct infusion using electrospray positive ionization and MRM mode (Masslynx software 4.1, Waters). The mobile phase used was the one included in NeoBase 1 kit. The quantifications were performed in Neolynx software, (Waters).

For GA and 3-OHGA analysis, an aqueous solution containing deuterium labeled internal standards GA-d4 and 3-OH-GA-d5 were added to cell extracts and were subjected to an Oasis HLB 96-well Plate (30 mg sorbent) extraction system. These metabolites were then eluted by acetonitrile/methanol (90/10) phase. To facilitate ionization formic acid at 0.4% solution was added. The analysis was done on an ACQUITY UPLC system H-Class-Xevo TQS tandem mass spectrometry (Waters). The chromatographic separation was performed on an ACQUITY Premier BEH C18 Column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) at a flow rate of 310 µL min⁻¹ using an isocratic binary mixture of 95% solvent A (water with 0.4% formic acid) and 5% solvent B (methanol with 0.4% formic acid). Detection was performed in electrospray positive and MRM mode (Masslynx software 4.1, Waters). Quantification was performed using a calibration curve (Targetlynx software, Waters) and normalized for protein content.

Mitochondrial superoxide levels analysis

Mitochondrial superoxide levels were measured by MitoSOXRed probe (M36008, Invitrogen). Experiments were performed following manufacturer's indications, incubating cells with 5 µM MitoSOXRed for 10 min at 37 °C. Cells were trypsinised and resuspended in PBS. Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry (BD FACS CANTOTM II) and FlowJo v10 Software.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

Malondialdehyde (MDA) levels were measured by the method of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), according to Janero DR[20]. Briefly, 250 µL of cell homogenate, 250 µL of trichloroacetic acid (40%) and 250 µL of thiobarbituric were added in a 5 ml glass tube. The mixture was incubated at 100 °C for 15 min. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane subjected to the same treatment as that of the samples. The reaction develops in a pink color that is proportional to the concentration of TBARS. The results were expressed as pmol TBARS/mg protein.

Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments. Statistical differences were determined using Prism (Graph-Pad V8 software, San Diego, CA, USA). Unless otherwise stated differences between experimental groups were analyzed by the non-parametric Mann–Whitney *U* test. The level of significance was considered for $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of the human neuroblastoma SH-SY5Y *GCDH* KO model

A neuronal model of GA1 was generated by knocking out *GCDH* in SH-SY5Y cells using CRISPR/Cas9. We designed 3 different gRNAs (sgRNA1, sgRNA2 and sgRNA3) targeting *GCDH* exons 3 and 4. Guides fulfilled the criteria of binding to target sites 5' to the PAM sequence with minimal off target cross-reactivity. Selected guides were cloned into the pLentiCRISPRv2 plasmid that contains the Cas9 and a pool of the three guides were transfected into SH-SY5Y neuroblastoma cells and submitted to puromycin selection. Individual clones were analyzed for both genomic alterations and *GCDH* expression. The absence of *GCDH* protein confirmed the generation of three *GCDH* KO cell lines (Supplementary Fig. 1A). Clone 1 was selected for further studies and named as SH-SY5Y *GCDH*-KO.

GCDH insertion in *GCDH* KO cells restores *GCDH* activity

To study whether *GCDH* gene transfer in the context of neuronal *GCDH* deficient cells could restore the enzyme deficiency and the associated cellular alterations, the SH-SY5Y *GCDH*-KO cells were modified with a vector expressing the *GCDH* gene to generate SH-SY5Y *GCDH*-GI cells. In this cassette, the *GCDH* gene was under the transcriptional control of the human PGK (hPGK) promoter and the EGFP promoterless was expressed from a genomic promoter after integration.

SH-SY5Y *GCDH*-KO cells were transfected with the pEGFP/PGK-*GCDH* vector. EGFP expressing cells were FACS sorted and analyzed for genomic integration (Supplementary Fig. 1B). FISH analysis identified insertion of the transgene in the chromosome 19, in the *GCDH* region and in a non-targeted region (Supplementary Fig. 1C).

Genetic Insertion (GI) of the pEGFP/PGK-*GCDH* cassette in *GCDH* neuroblastoma KO cells generated the SH-SY5Y *GCDH*-GI cell line and resulted in the expression of the *GCDH* protein (Fig. 1A). The newly expressed protein displayed enzyme activity as shown by the in-gel activity assay performed by BN-PAGE (Fig. 1B).

Neuronal *GCDH*-KO cells recapitulate GA-I cellular alterations that are rescued in the gene-corrected cells

To validate SH-SY5Y *GCDH*-KO cells as a human neuronal model to study GA1, we analyzed several parameters that have been associated to the neuropathology of this disease. *GCDH* deficiency in GA1 patients results in the accumulation of GA, 3-OHGA and C5DC in patient groups classified as high and low excretors [21]. To evaluate whether *GCDH* neuroblastoma KO cells, were able to accumulate GA1 metabolites, cells were cultured with Lys 10 mM, a dose considered to mimic the situation of a catabolic stress, to stimulate the Lys catabolic pathway [22, 23]. This supplementation led to a significant increase of the three metabolites, GA, 3-OHGA and C5DC in KO cells whereas the *GCDH*-GI model showed similar levels to WT cells (Fig. 1C). Thus, despite there is only a 50% protein rescue in the *GCDH*-GI model compared to WT cells, such *GCDH* activity would be sufficient to prevent metabolites increase.

The accumulation of GA and 3-OHGA in brain tissue are the main triggers of cellular damage in CNS cell types [15, 16]. However, neuronal susceptibility to cell death triggered by GA1 metabolites has been controversial with different vulnerabilities in mouse and rat neuronal cultures. Rat striatal neurons deficient in *GCDH* by lentivirus knockdown were found to undergo apoptosis

[23, 24]. However, a very mild or even lack of induced toxicity has been observed after GA or Lys stimulation of striatal, hippocampal or cortical neurons of *Gcdh*^{-/-} mice. Of notice, striatal neurons were vulnerable to GA or Lys stimulated astrocytes, suggesting an astrocyte contribution to the detrimental effects observed on primary neurons [25]. Such different response to GA1 metabolites induction of neuronal death might be related to particular inter-species vulnerabilities. In fact, genetic determinants of susceptibility to neuronal cell death have already been defined between certain strains of mice [26]. Differences in response to cellular stress under identical insults have also been found between human and mouse neurons [27]. Moreover, human astrocytes have been shown to exhibit greater susceptibility to oxidative stress than mouse astrocytes [28]. Recently, a cross-species analysis of single-cell RNA seq highlighted expanded diversity between specific neurons of mice, non-human primates and humans [29]. All these data, highlights the need to study neuronal response to GA1 metabolites not only in animal models but importantly in human neuronal models of GA1. In this line, we investigated the susceptibility of the human neuroblastoma SH-SY5Y *GCDH*-KO cells to GA or Lys overload. Exposure to GA triggered cellular toxicity in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Such cellular mortality could probably be mediated by apoptosis since transcript levels of caspase-3 were increased (Fig. 2B), in line with previous work [24]. Interestingly, these effects were not observed in cells reconstituted with *GCDH* function, demonstrating the specificity of the effects.

To determine whether Lys exposure compromises neuronal cell viability in *GCDH* deficient cells, SH-SY5Y WT, *GCDH*-KO, and *GCDH*-GI were treated with 10 mM and 25 mM Lys for 24 h. Exposure to Lys led to 30% and 50% decrease in the metabolic activity of the cells in the *GCDH*-KO but not in *GCDH*-GI (Fig. 3A). Similar results were observed in terminally differentiated neurons (Supplementary Fig. 2). In a Hoechst 33342 fluorometric assay Lys treatment revealed reduced fluorescent intensity in *GCDH*-KO but not in *GCDH*-GI cells neither in WT cells (Fig. 3B). Such effects were not associated to the activation of cell death by apoptosis since the number of apoptotic cells in *GCDH*-KO was not altered by the incubation with Lys in the Annexin V assay (Fig. 3C) neither by analysis of caspase-3 mRNA content (data not shown). It can be speculated that the amount of GA accumulated upon 10 mM or 25 mM Lys was not sufficient to activate an apoptotic program, at least after 24 h exposure. However, these results suggest that high Lys triggered neuronal injury in *GCDH*-KO cells resulting in decreased metabolic activity and cell proliferation, that could be rescued by restoring *GCDH* activity. A proposed mechanism of neurotoxicity induced by GA and 3-OHGA metabolites is through the activation of oxidative stress. Menadione, a precursor in the synthesis of Vitamin K, is a potent inducer of ROS production and through an oxidative stress mechanism triggers cell death [30]. Primary astrocytes from *Gcdh*^{-/-} mice have shown increased vulnerability to menadione-induced oxidative stress [31]. In this context, we studied the susceptibility of neuroblastoma *GCDH*-KO cells to menadione treatment. Incubation of menadione for 6 h at 2.5 μ M and 3.5 μ M showed a dose-dependent decreased viability in the MTT assay that was not observed in SH-SY5Y *GCDH*-GI nor in WT cells, suggesting that *GCDH* KO cells were more susceptible to oxidative stress (Supplementary Fig. 3). Next, we investigated the induction of mitochondrial ROS upon Lys overload. A tendency to increased MitoSOXRed intensity was observed in all the cell lines (Fig. 4A). Interestingly, 10 mM Lys significantly augmented SOD concentration in *GCDH*-KO cells but not in the other cell lines, showing the activation of an antioxidant response in *GCDH*-KO cells, probably as a compensatory mechanism (Fig. 4B). We studied lipid peroxidation in these models since it is a well-known process where ROS attack lipids in cellular membranes generating toxic aldehydes like malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal 4-HNE [32]. Moreover, exposure of *Gcdh*^{-/-}

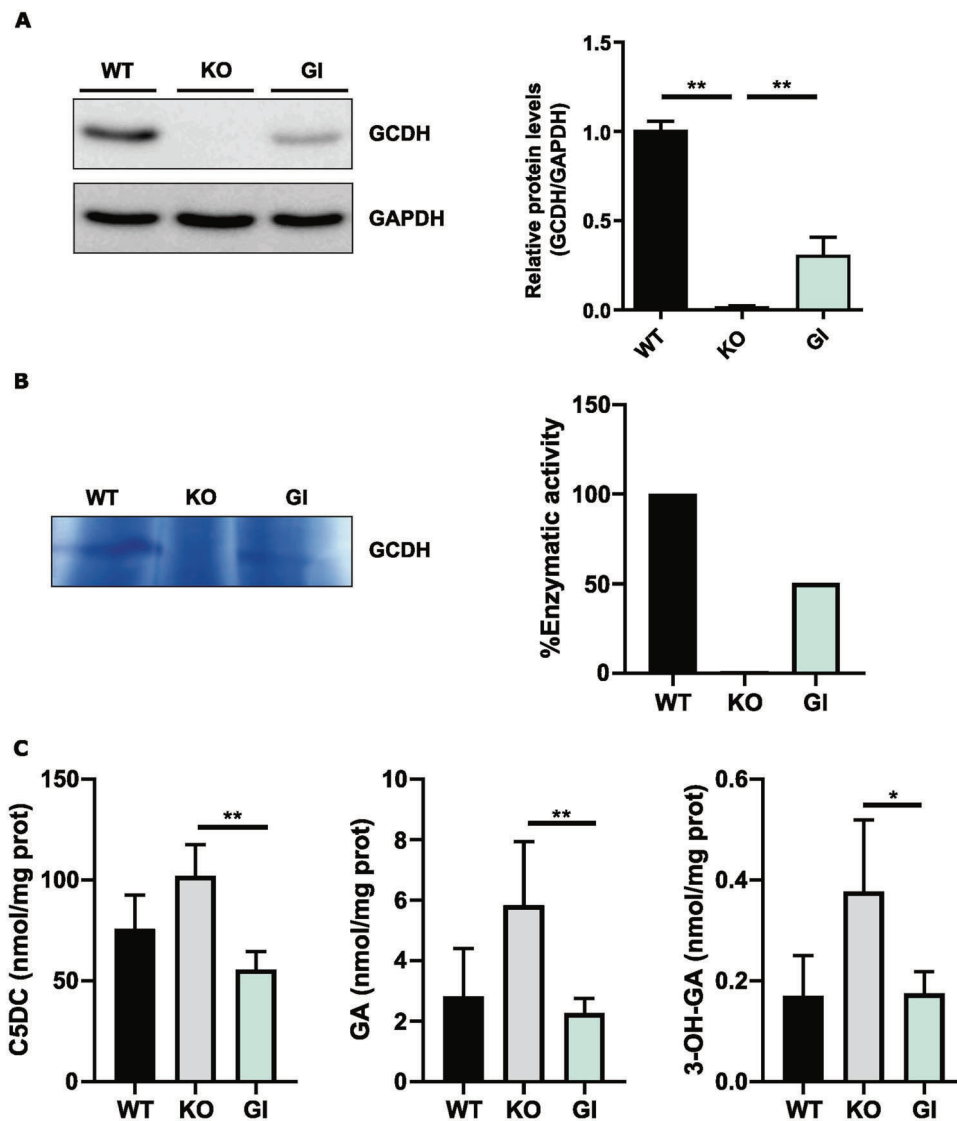


Fig. 1 Characterization of SH-SY5Y *GCDH*-KO and SH-SY5Y *GCDH*-GI cells. **A** Western blot showing *GCDH*-KO and *GCDH* expression in WT and *GCDH*-GI cells. **B** In gel enzymatic *GCDH* activity in WT and *GCDH*-GI cells. **C** Metabolite quantification: Glutaryl carnitine (C5DC), glutaric acid (GA) and 3-hydroxyglutaric acid (3-OHGA) were measured in the media of SH-SY5Y- WT, SH-SY5Y *GCDH*-KO and SH-SY5Y *GCDH*-GI after 48 h of 10 mM Lys exposure ($n = 4-6$). Data are shown as mean $\pm$ SEM; Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

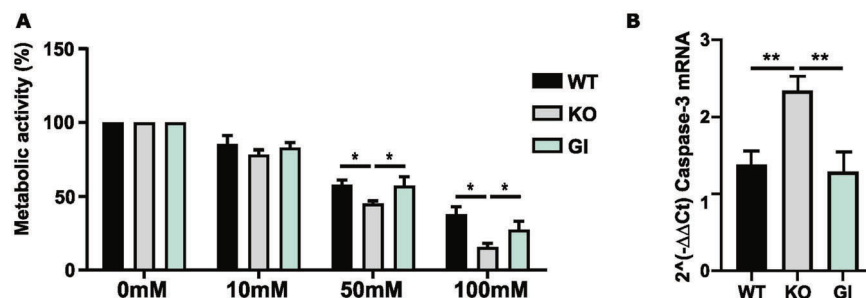


Fig. 2 Glutamic acid triggers SH-SY5Y *GCDH*-KO cell death. **A** Cells were exposed to Glutamic acid (0-10-50-100 mM) and MTT assays were performed 24 h later ($n = 8-9$). **B** qPCR mRNA quantification of caspase 3 levels in cells exposed to 50 mM of GA for 6 h ($n = 6-8$). Data are shown as mean $\pm$ SEM; Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

astrocytes to 10 mM lysine has shown increased MDA levels and feeding *Gcdh*^{-/-} mice with high Lys diet showed increased MDA in cortex and striatum [25, 33]. In line with these data where MDA content was increased in *GCDH* deficient cells exposed to high

Lys, we observed that Lys treatment to neuroblastoma *GCDH*-KO cells triggered a significant increase in MDA that was not observed in gene-corrected SH-SY5Y *GCDH*-GI cells neither in WT cells (Fig. 4C). These results show higher vulnerability of the SH-SY5Y

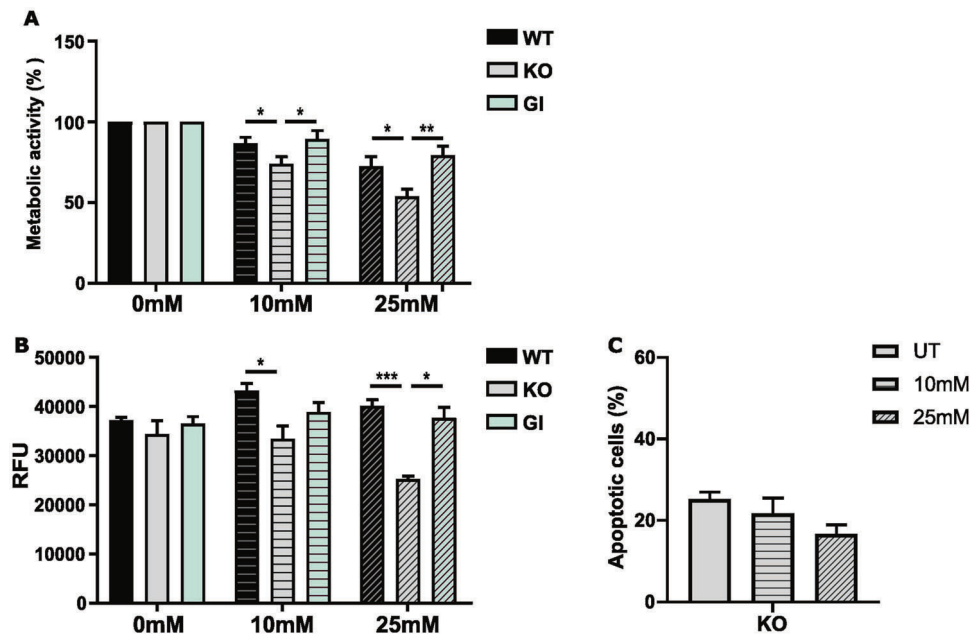


Fig. 3 Lysine exposure compromises neuronal SH-SY5Y *GCDH*-KO metabolic activity. Cells were exposed to Lys (0–10–25 mM) for 24 h. **A** MTT assays ($n = 8–9$) **(B)** Hoechst 33342 fluorescence quantification ($n = 4$). Results are expressed as Relative Fluorescent Units (RFU). **C** Annexin V-FITC/PI apoptotic cells quantification ($n = 4$). Data shown as mean $\pm$ SEM; Mann-Whitney test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

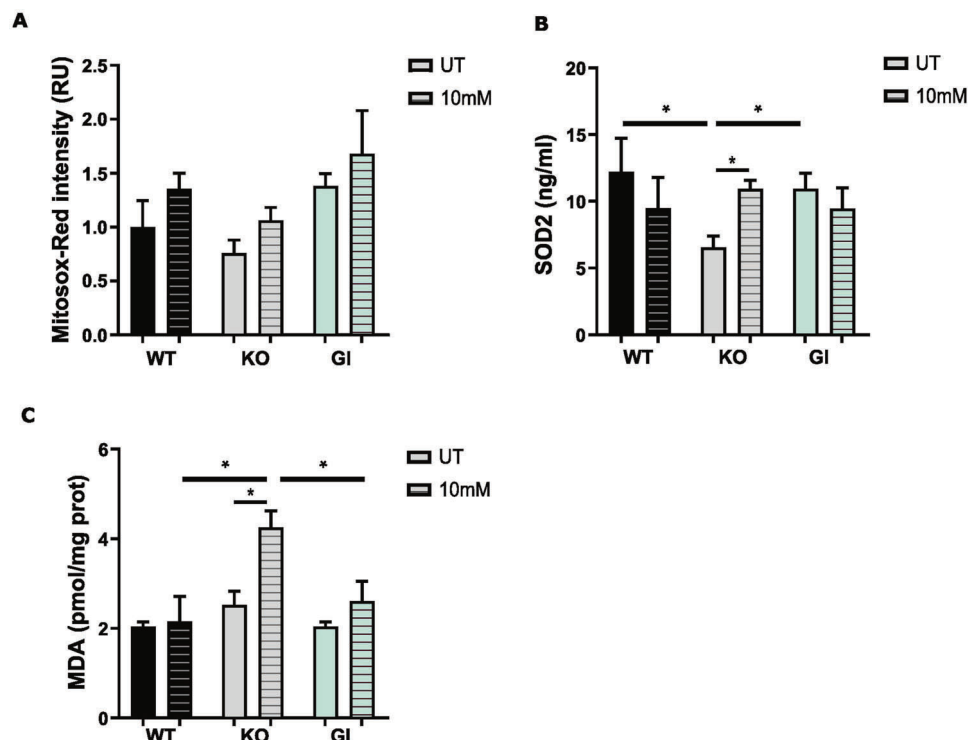


Fig. 4 SH-SY5Y *GCDH*-KO cells are susceptible to oxidative stress. Cells were exposed to 10 mM Lys for 72 h. **A** Mitochondrial superoxide anion levels were analyzed by MitoSOXRed staining ($n = 3$). **B** Antioxidant capacity was measured by SOD2 ELISA assay ($n = 4$). **C** TBARS lipid peroxidation assay. MDA levels were measured ($n = 5$). Data are shown as mean $\pm$ SEM; Mann-Whitney test: * $p < 0.05$.

GCDH-KO to oxidative stress. Probably, a small increase in reactive species may signal to activate antioxidant defenses, but deficient-*GCDH* cells could not successfully resolve making lipids vulnerable to oxidative damage. We can speculate that the neuronal damage detected in the human SH-SY5Y *GCDH*-KO model may possible reflect some of the abnormalities observed in affected patients.

In conclusion, the present results provide experimental evidence that neuroblastoma SH-SY5Y *GCDH*-KO can be a good human model to gain further insight into the neuronal defects of *GCDH* deficiency. Moreover, our data also shows that expression of *GCDH*, from the PGK promoter provides with a *GCDH* activity that is sufficient to prevent from the damage effects induced by

the accumulation of GA or 3-OHGA in neurons. Consequently, *GCDH* gene replacement can be envisioned as a potential gene therapy strategy for GA1 patients.

DATA AVAILABILITY

Data is available within the published article and supplementary files. Additional data are available from corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, Teng CC. Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism. *Biochem Med*. 1975;12:12–21.
- Schuurmans IME, Dimitrov B, Schröter J, Ribes A, de la Fuente RP, Zamora B, et al. Exploring genotype–phenotype correlations in glutaric aciduria type 1. *J Inher Metab Dis*. 2023;46:371–90.
- Yuan Y, Dimitrov B, Boy N, Gleich F, Zielonka M, Kölker S. Phenotypic prediction in glutaric aciduria type 1 combining in silico and in vitro modeling with real-world data. *J Inher Metab Dis*. 2023;46:391–405.
- Kölker S, Sauer SW, Hoffmann GF, Müller I, Morath MA, Okun JG. Pathogenesis of CNS involvement in disorders of amino and organic acid metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2008;31:194–204.
- Kölker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, et al. Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res*. 2006;59:840–7.
- Pérez-Dueñas B, De La Osa A, Capdevila A, Navarro-Sastre A, Leist A, Ribes A, et al. Brain injury in glutaric aciduria type I: the value of functional techniques in magnetic resonance imaging. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2009;13:534–40.
- Couce ML, López-Suárez O, Bóveda MD, Castiñeiras DE, Cocho JA, García-Villoria J, et al. Glutaric aciduria type I: outcome of patients with early- versus late-diagnosis. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2013;17:383–9.
- Boy N, Mühlhausen C, Maier EM, Heringer J, Assmann B, Burgard P, et al. Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision. *J Inher Metab Dis*. 2017;40:75–101.
- Boy N, Mühlhausen C, Maier EM, Ballhausen D, Baumgartner MR, Beblo S, et al. Recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: third revision. *J Inher Metab Dis*. 2023;46:482–519.
- Busquets C, Begon B, Merinero B, Julia J, Vaquerizo J, Orozco M, et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. 2000;48:315–22.
- Koeller DM, Woontner M, Crnic LS, Kleinschmidt-DeMasters B, Stephens J, Hunt EL, et al. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet*. 2002;11:347–57.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Housman C, LaNoue K, O'Callaghan JP, Simpson I, et al. Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J Clin Invest*. 2007;117:3258–70.
- Zinnanti WJ, Lazovic J, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith MB, Connor JR, et al. A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain*. 2006;129:899–910.
- Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Müller I, Crnic LR, et al. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem*. 2006;97:899–910.
- Kölker S, Koeller DM, Okun JG, Hoffmann GF. Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol*. 2004;55:7–12.
- Rodrigues MDN, Seminotti B, Amaral AU, Leipnitz G, Goodman SI, Woontner M, et al. Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: a potential role for glutamatergic-induced excitotoxicity in GA I neuropathology. *J Neurol Sci*. 2015;359:133–40.
- Rio P, Baños R, Lombardo A, Quintana-Bustamante O, Alvarez L, Garate Z, et al. Targeted gene therapy and cell reprogramming in Fanconi anemia. *EMBO Mol Med*. 2014;6:835–48.
- Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp*. 2016;108:53193.
- Wittig I, Braun H-P, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc*. 2006;1:418–28.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990;9:515–40.
- Baric I, Wagner L, Feyh P, Liesert M, Buckel W, Hoffmann GF. Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J Inher Metab Dis*. 1999;22:867–81.

- Cudré-Cung HP, Remacle N, do Vale-Pereira S, Gonzalez M, Henry H, Ivanisevic J, et al. Ammonium accumulation and chemokine decrease in culture media of Gcdh-/- 3D reaggregated brain cell cultures. *Mol Genet Metab*. 2019;126:416–28. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.01.009>.
- Gao J, Zhang C, Fu X, Yi Q, Tian F, Ning Q, et al. Effects of targeted suppression of Glutaryl-CoA dehydrogenase by lentivirus-mediated shRNA and excessive intake of lysine on apoptosis in rat striatal neurons. *PLoS One*. 2013;8:e63084.
- Fu X, Gao H, Tian F, Gao J, Lou L, Liang Y, et al. Mechanistic effects of amino acids and glucose in a novel glutaric aciduria type 1 cell model. *PLoS One*. 2014;9:e110181.
- Olivera-Bravo S, Ribeiro CAJ, Isasi E, Trias E, Leipnitz G, Díaz-Amarilla P, et al. Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh-/- mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum Mol Genet*. 2015;24:4504–15.
- Schauwecker PE, Steward O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4103–8.
- Martin LJ, Chang Q. DNA damage response and repair, DNA methylation, and cell death in human neurons and experimental animal neurons are different. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77:636–55.
- Li J, Pan L, Pembroke WG, Rexach JE, Godoy MI, Condro MC, et al. Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. *Nat Commun*. 2021;12:3958.
- Bakken TE, van Velthoven CT, Menon V, Hodge RD, Yao Z, Nguyen TN, et al. Single-cell and single-nucleus RNA-seq uncovers shared and distinct axes of variation in dorsal LGN neurons in mice, non-human primates, and humans. *Elife*. 2021;10:e64875.
- Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1925–36.
- Rodrigues MDN, Seminotti B, Zanatta A, de Mello Gonçalves A, Bellaver B, Amaral AU, et al. Higher vulnerability of menadione-exposed cortical astrocytes of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice to oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cell death: implications for the neurodegeneration in glutaric aciduria type I. *Mol Neurobiol*. 2017;54:4795–805.
- Tripathi R, Gupta R, Sahu M, Srivastava D, Das A, Ambasta RK, et al. Free radical biology in neurological manifestations: mechanisms to therapeutics interventions. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29:62160–207.
- Seminotti B, Amaral AU, da Rosa MS, Fernandes CG, Leipnitz G, Olivera-Bravo S, et al. Disruption of brain redox homeostasis in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice treated with high dietary lysine supplementation. *Mol Genet Metab*. 2013;108:30–9.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Paula del Río for providing us with the plasmid pCCL.PGK.FANCA.WPRE. We are indebted to the Flow Cytometry Platform of IDIBAPS for technical help.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM-B and ES-B performed the functional experiments and prepared the figures. JG-V developed the methods for metabolite analysis helped on the metabolite analysis, SG-S generated the constructs and contributed with some functional experiments. FT participated in the *GCDH* enzyme activity assays, GG and MG-M helped with the analysis of lipid peroxidation, AR provided GA1 pathology expertise and contributed to manuscript writing, JC, IR, and JR performed the FISH analysis, CF coordinated the study and wrote the manuscript.

FUNDING

AM-B is recipient of a PIF-Salut predoctoral contract from Generalitat de Catalunya, Spain. MG-M is recipient of a Sara Borrell contract CD21/00019 from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). This work was supported by grants to CF from the CIVP19A5949-Fundación Ramon Areces, Merck Sharp Dohme España S.A., ACCI-CIBERER (ER21P2AC737) and PID2020-119692RB-C22 Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, with partial support from the Generalitat de Catalunya SGR2021/01169 and SGR2021/01423. It also acknowledges the support of CHARLIE Consortium, a project supported by ISCIII under the frame of E-Rare-3, the ERA-Net for Research on Rare Diseases, EJPRD grant nr: 825575. CIBERER is an initiative of the ISCIII. We also acknowledge the support of CERCA Program/Generalitat de Catalunya. This work was developed at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICAL APPROVAL

The authors declare compliance with ethical standards.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41434-023-00428-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C. Fillat.

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

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

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Systemic delivery of AAV-GCDH ameliorates HLD-induced phenotype in a glutaric aciduria type I mouse model

Anna Mateu-Bosch,^{1,6} Eulàlia Segur-Bailach,^{1,2,6} Emma Muñoz-Moreno,¹ María José Barallobre,^{1,5} Maria Lourdes Arbonés,^{1,5} Sabrina Gea-Sorlí,^{1,2} Frederic Tort,^{1,2,3} Antonia Ribes,^{1,2,3} Judit García-Villoria,^{1,2,3} and Cristina Fillat^{1,2,4}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 08036 Barcelona, Spain; ³Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, 08028 Barcelona, Spain; ⁴Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; ⁵Instituto de Biología Molecular de Barcelona, IBMB-CSIC, Parc Científic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Glutaric aciduria type 1 (GA1) is a rare inherited metabolic disorder caused by a deficiency of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase (GCDH), with accumulation of neurotoxic metabolites, resulting in a complex movement disorder, irreversible brain damage, and premature death in untreated individuals. While early diagnosis and a lysine restricted diet can extend survival, they do not prevent neurological damage in approximately one-third of treated patients, and more effective therapies are required. Here we report the efficacy of adeno-associated virus 9 (AAV9)-mediated systemic delivery of human GCDH at preventing a high lysine diet (HLD)-induced phenotype in *Gcdh*^{-/-} mice. Neonatal treatment with AAV-GCDH restores GCDH expression and enzyme activity in liver and striatum. This treatment protects the mice from HLD-aggressive phenotype with all mice surviving this exposure; in stark contrast, a lack of treatment on an HLD triggers very high accumulation of glutaric acid, 3-hydroxyglutaric acid, and glutarylcarnitine in tissues, with about 60% death due to brain accumulation of toxic lysine metabolites. AAV-GCDH significantly ameliorates the striatal neuropathology, minimizing neuronal dysfunction, gliosis, and alterations in myelination. Magnetic resonance imaging findings show protection against striatal injury. Altogether, these results provide preclinical evidence to support AAV-GCDH gene therapy for GA1.

INTRODUCTION

Glutaric aciduria type 1 (GA1; MIM: 231670) is an inborn error of metabolism that was first described in 1975.¹ It has an estimated prevalence of 1 in 100,000 in newborns in the general population, and of 1 in 250 in high-risk populations.^{2,3} This disease is caused by mutations in the *GCDH* gene, causing a deficiency of the glutaryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase (GCDH; EC: 1.3.99.7), which is responsible for the dehydrogenation and decarboxylation of glutaryl-CoA in the catabolic pathway of lysine, hydroxylysine, and tryptophan. The human *GCDH* gene is located on chromosome 19p13.2, spans 7 kb,

and consists of 11 exons and 10 introns. The inheritance pattern of GA1 is autosomal recessive, and currently more than 200 mutations in the *GCDH* gene have been identified.³ GCDH deficiency leads to the accumulation of glutaric acid (GA) and 3-hydroxyglutaric acid (3-OHGA), which are neurotoxic, as well as to an increase of glutaryl-carnitine (C5DC), which can deplete carnitine from body fluids and tissues.⁴ Untreated individuals mostly develop a complex movement disorder between the ages of 3 and 36 months, due to bilateral striatal damage precipitated by catabolic events such as intercurrent febrile illness or prolonged fasting caused by infections or surgical procedures. After an episode of this type, individuals develop dystonia, choreoathetosis (or choreoathetotic movements), and spasticity, with severe neurological damage typical of an acute encephalopathic crisis.⁵ The life expectancy of affected individuals is very variable: some individuals with severe neurological damage can reach adulthood, but approximately one-half of affected children die during their first decade of life during an acute episode.^{6–8}

Currently, the only available treatment for individuals with GA1 is based on a lysine-restrictive diet and supplementation of L-carnitine. Despite the possibility of early detection due to the inclusion of GA1 in newborn screening programs and quick treatment initiation, it has still not been possible to prevent cerebral damage totally or disease progression in approximately one-third of individuals with GA1.^{2,9,10}

A genetic mouse model of GA1 has been developed to better understand the disease pathology. Mice with complete loss of *GCDH* (*Gcdh*^{-/-}) (herein, knock-out [KO]) are viable, have a normal

Received 11 October 2023; accepted 31 May 2024;
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101276>.

⁶These authors contributed equally

Correspondence: Cristina Fillat, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: cfillat@recerca.clinic.cat



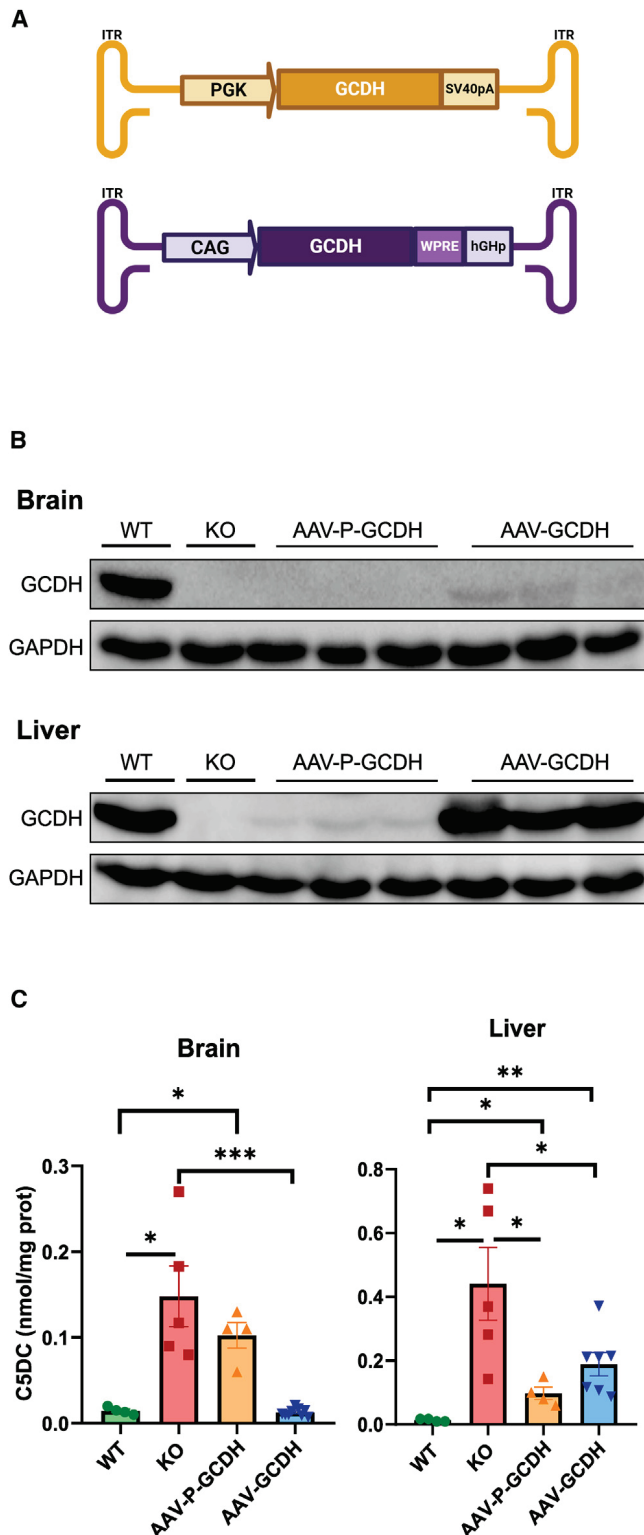


Figure 1. AAV9 vector expressing GCDH from the CAG promoter shows superior phenotype amelioration than that expressed from the PGK promoter

appearance, and present a biochemical profile very similar to individuals with GA1: they have high levels of GA and 3-OHGA in urine and brain tissues, and high levels of C5DC in serum.¹¹ Exposure of *Gcdh* KO mice to elevated levels of dietary protein containing lysine aggravates disease presentation, with tissue and serum accumulation of metabolites and noticeable signs of striatal neurodegeneration. The KO mouse model shows age-dependent susceptibility to brain injury, similar to the human condition, with strong lethality when mice are fed a high-lysine diet (HLD) at weaning.^{12,13} KO mice that survive into adulthood have severe neuropathological alterations, with neuronal loss, vacuolation, and (in some cases) intraventricular hemorrhages.^{14,15}

Studies using these KO mice have been key for developing novel therapeutic strategies. Notably, feeding the KO mice a low lysine, high glucose diet decreased the accumulation of neurotoxic metabolites in the brain,¹⁶ which is why most patients currently receive this type of diet in combination with an oral supplement of L-carnitine. This strategy considerably decreases the frequency of acute encephalopathic episodes and, therefore, mortality.¹⁷ However, despite the efforts made for early detection, by including this disease in the newborn screening programs and dietary treatment, some patients still develop encephalopathic crises.⁹

Here, we have explored the feasibility of gene therapy for GA1 based on the intravenous administration of an adeno-associated virus 9 (AAV9) that transports the *GCDH* gene. We demonstrate that a single intravenous injection of AAV-*GCDH* in neonatal *Gcdh* KO mice decreases GA and 3-OHGA accumulation, ameliorates striatal injury, and rescues the lethal phenotype of mice fed an HLD.

RESULTS

Intravascular delivery of AAV9-*GCDH* driven by the CAG promoter displays GCDH expression in brain and prevents C5DC accumulation

We constructed two AAV9 vectors expressing the human *GCDH* gene, one under the control of the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter (AAV-P-*GCDH*), and one under the control of the chimeric cytomegalovirus (CMV) enhancer and chicken β -actin promoter (CAG) promoter (AAV-*GCDH*) (Figure 1A). The PGK promoter was chosen for its ability to drive mild expression of the transgenes, whereas the CAG promoter has been widely shown to exhibit strong expression of the controlled genes.^{18,19} Since *GCDH* deficiency mostly leads to neuropathological alterations, we selected the AAV serotype AAV9 for its widespread transduction of the CNS parenchyma and its ability to cross the blood-brain barrier after intravascular delivery.^{20,21} Tail vein injection of AAV-P-*GCDH* or AAV-*GCDH* at a dose of

(A) Schematic illustration of the AAV-P-*GCDH* and AAV-*GCDH* vectors. (B) Western blot analysis of GCDH in liver and brain extracts from 6-week-old *Gcdh* KO mice treated with 7.5×10^{12} vg/kg of the indicated virus ($n = 3$). (C) C5DC content in liver and brain extracts from WT, KO, or KO-treated animals with AAV-P-*GCDH* or AAV-*GCDH* ($n = 4$ to 9). Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

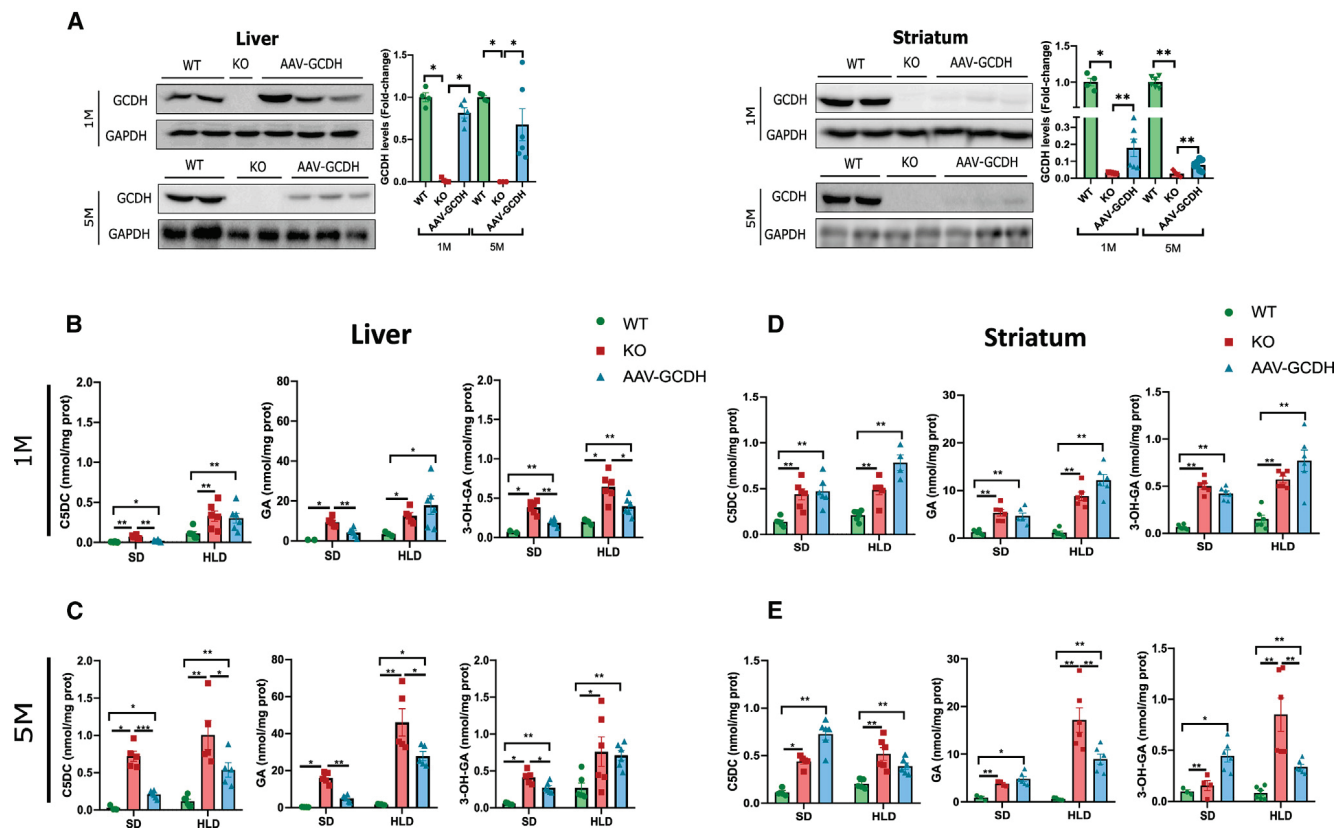


Figure 2. Intravascular administration of AAV-GCDH in KO young adult mice improves metabolite accumulation in the liver and in the striatum after HLD exposure at 5 months after treatment

AAV-GCDH was injected via tail vein at a dose (7.5×10^{12} vg/kg) into 1-month-old mice; 1 week later, mice were placed onto an HLD regime, or kept on a standard diet (SD), for 3 weeks or 5 months. (A) Western blot analysis of GCDH in liver and striatum lysates at 1 month and 5 months after treatment. Quantification of GCDH from different individuals ($n = 4-6$). C5DC, GA, and 3-OH GA were measured in WT, KO, and KO-AAV-GCDH treated mice in the liver at 1 month (B) or 5 months (C) after therapy, and in the striatum at 1 month (D) or 5 months (E) after therapy. Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test. Statistical significance between WT-standard diet and WT-HLD were observed for C5DC in (B, D, and E) and for GA and 3-OH GA in (C). Statistical significance between KO-standard diet and KO-HLD were observed for GA in (C, D, E) and for 3-OH GA in (B, E). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.5×10^{12} vg/kg into 4-week-old *Gcdh* KO mice resulted in the recovery of GCDH expression in the liver with both vectors (albeit to much higher levels with AAV-GCDH). However, transgene expression in the brain was only observed in mice receiving the AAV-GCDH (Figure 1B). To assess the potential of the *GCDH* transgene to modulate the tissue accumulation of metabolites in KO mice, we measured the C5DC content. Notably, both AAV-P-GCDH and AAV-GCDH were able to decrease the accumulation of C5DC in the liver of treated *Gcdh* KO mice. However, only AAV-GCDH was able to decrease the content of this metabolite in the brain (Figure 1C). Thus, we chose the AAV construct with the CAG promoter as the candidate virus to evaluate the potential of GA1 gene therapy.

Intravenous AAV-GCDH delivery to young *Gcdh* KO mice prevents accumulation of diet-induced metabolites in target tissues up to 5 months after therapy

Next, we explored whether the AAV-GCDH vector could rescue the phenotype of the *Gcdh* KO mice, and especially their severe phenotype

induced by feeding an HLD regime. KO mice were injected in the tail vein with a single dose of 7.5×10^{12} vg/kg AAV-GCDH at 4 weeks of age. One week later, treated or non-treated (control) animals were placed on a standard diet or an HLD for 1 month or 5 months. Mice were euthanized at 2 months of age (corresponding with 1 month after therapy) or 6 months of age (5 months after therapy), and tissues were analyzed for GCDH expression, enzyme activity, vector bio-distribution, and metabolite accumulation. GCDH was expressed in the liver of treated KO mice at similar levels as in wild-type (WT) mice at 1 month after treatment, but the expression decreased after 5 months (Figure 2A). Expression of GCDH was analyzed in the striatum, as the targeted brain region of GA1 neuropathology. Low levels of GCDH were detected at both time points (Figure 2A). Consistently, GCDH activity was detected at both ages in the liver, but not in the striatum (Figure S1A). The analyses of C5DC, GA, and 3-OHGA revealed an increase in all the metabolite content in KO mice fed a standard diet, in line with previously reported studies.¹¹ A statistically significant decrease in all these metabolites was observed in the liver of

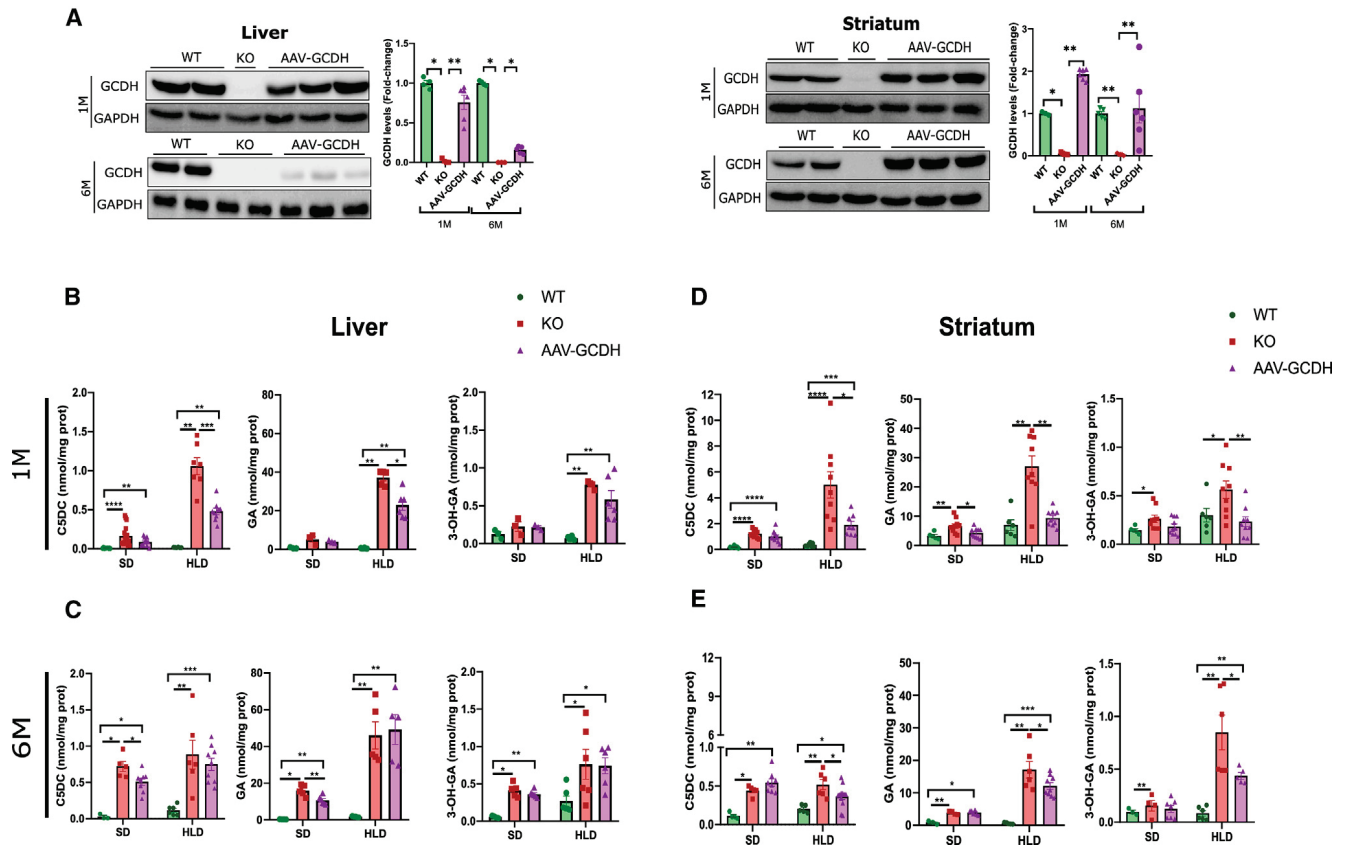


Figure 3. Intravascular administration of AAV-GCDH in KO-neonatal mice restores enzyme activity and prevents HLD-induced metabolite accumulation in the striatum at 1 month and 6 months after treatment

AAV-GCDH was injected into the temporal vein (at 5×10^{13} vg/kg) at P1, and at weaning were fed a standard diet (SD) or an HLD for 4 days or 5 months. Readouts were performed at 1 month and 6 months after viral injection. (A) Western blot analysis of GCDH in liver and striatum lysates at 1 month and 6 months after treatment. Quantification of GCDH from different individuals is shown ($n = 4-6$). C5DC, GA, and 3-OH GA concentrations in liver are shown for 1 month (B) and 6 months (C) after therapy, and in the striatum at 1 month (D) or 6 months (E) after therapy. Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test. Statistical significance between WT-standard diet and WT-HLD were observed for C5DC in (E), and for GA and 3-OH GA in (C). Statistical significance between KO-standard diet and KO-HLD were observed for C5DC (B and D), GA (B-E), and 3-OHGA (B, D, E). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

treated KO mice fed a standard diet, and this reduction lasted until 5 months after therapy (Figures 2B and 2C). Placing mice on an HLD regime increased some of the metabolites, both in WT and KO mice, with the highest accumulation seen in the HLD-fed KO mice (herein, KO-HLD). The HLD increase in metabolite concentrations could be partially compensated by the therapy, with the 3-OHGA content significantly reduced with 1 month of therapy, and the C5DC and GA with 5 months of therapy (Figures 2B and 2C). Analysis of the metabolite content in the striatum showed that treatment with AAV-GCDH did not correct the levels of the C5DC, GA, or 3-OHGA metabolites when mice were fed a standard diet (Figures 2D and 2E). Similar to what we observed in the liver, HLD also triggered accumulation of some metabolites in WT and KO mice, again with the highest content in KO-HLD animals. However, a decrease in GA and 3-OHGA after 5 months of an HLD were observed in the striatum of treated mice (Figures 2D and 2E). These results suggest that increased sustained expression of GCDH for

5 months could be sufficient to prevent HLD-induced metabolite accumulation in target tissues.

Intravascular neonatal AAV-GCDH administration improves the phenotype of *Gcdh* KO mice exposed to an HLD

Since GA1 pathologic events impact individuals in early infancy, the effects of *GCDH* gene therapy would be particularly desirable at early stages of life to prevent the development of encephalopathic crises. We, therefore, considered evaluating the effects of AAV-GCDH therapy upon administration in neonatal mice.

Gcdh KO mice were injected with 5×10^{13} vg/kg of AAV-GCDH vector into the temporal vein at the neonatal P1 stage. At 25 days after injection, mice were placed onto a standard diet or an HLD regime for 4 days or for 5 months; mice were then euthanized at 1 or at 6 months after treatment. GCDH expression at 1 month after therapy showed high levels of the transgene in both liver and striatum (Figure 3A).

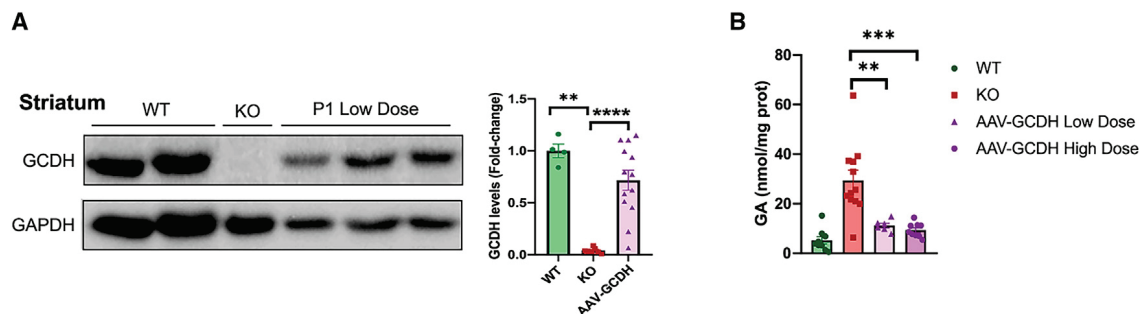


Figure 4. Intravascular administration of AAV-GCDH in KO-neonatal mice prevents from HLD-induced GA accumulation in the striatum at 1 month after therapy

AAV-GCDH were injected in the temporal vein at a dose 7.5×10^{12} vg/kg (Low dose) at P1. At weanling were exposed to HLD for 4 days. Analysis were performed 1 month after viral injection. (A) Western blot analysis of GCDH in the striatum. Quantification of GCDH from different individuals ($n = 6$). (B) Analysis of GA concentration ($n = 6$). Results also show the GA concentration of AAV-GCDH treated mice at 5×10^{13} vg/kg (Figure 3D; high dose). Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

At 6 months after therapy, there was a decrease in the liver GCDH content (Figure 3A). Notably, although there was some decrease in GCDH expression in the striatum at 6 months after treatment as compared with 1 month after treatment, GCDH levels stayed similar to those of WT mice (Figure 3A). The differences in the persistence of GCDH expression between organs could be due to a dilution effect related to organ growth. In fact, the brain weight of C57BL/6J mice from postnatal day 17 (P17) to P60 does not show significant differences whereas there is more than a 4-fold increase in the mouse liver from P21 to P60.^{22,23} Nevertheless, we cannot exclude the presence of other contributing factors, such as the rate of cellular turnover in the different organs. The persistence of GCDH activity was detected both at 1 and 6 months after therapy in the tissues analyzed (Figure S1B). Analysis of metabolites in the liver of treated mice showed metabolite correction at 1 month after therapy; however, this was not sustained at 6 months after treatment in KO-HLD mice, probably due to the reduced expression of GCDH in the liver at this age (Figures 3B and 3C). Interestingly, AAV-GCDH therapy corrected the accumulation of C5DC and the neurotoxic metabolites GA and 3-OHGA in the striatum of the KO-HLD mice, at both 1 and 6 months after therapy (Figures 3D and 3E). Correction of GA metabolites was also observed when applied a lower dose of 7.5×10^{12} vg/kg (Figure 4). Since GA1 pathology induced by the GA and 3-OHGA toxicity results in selective striatal degeneration we analyzed neuronal integrity by measuring N-acetyl aspartate (NAA) and its derivative metabolite, NAA glutamate (NAAG), by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (MRS) in the striatum. A statistically significant decrease in the NAA+NAAG content was observed in HLD *Gcdh* KO mice that was partially rescued by treatment (Figure 5A). Moreover, magnetic resonance imaging (MRI) analysis revealed extensive brain injury in KO-HLD mice, as shown by reduced mean diffusivity (MD), which was less evident in KO-HLD mice at 1 month after AAV-GCDH therapy (Figure 5B). Voxel-wise statistical analysis of the MD maps between WT and KO-HLD mice revealed extensive areas of significant differences, whereas WT and AAV-GCDH-treated KO-HLD mice showed greater similarities, again suggesting the rescue of the brain damage in treated mice (Figure S2).

Exposure of weanlings to an HLD has been associated with vacuolation, myelin pathology, and signs of gliosis.^{13,24} Histopathology of striatum of *Gcdh* KO mice on an HLD confirmed irregular vacuolation with increased vacuole size after chronic feeding with HLD for 5 months. No changes were observed in WT mice on either a standard diet or an HLD (Figure S3). Interestingly, AAV-GCDH prevented large vacuole formation (Figure 6). Importantly, AAV-GCDH administration to *Gcdh* KO mice on a standard diet did not show virus-related histopathological findings, suggesting the safety of the treatment (Figure S3). Astrocyte damage analyzed by glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining, showed abundant GFAP in KO-HLD mice, in line with a diet-induced gliosis, but was almost absent after therapy (Figure 6). Myelin basic protein (MBP) staining revealed a progressive hypomyelination already present in older KO mice on a standard diet, with an enhanced decrease in the number of myelinated areas in the striatum of KO-HLD mice, after a 1- or 5-month diet regime. AAV-GCDH-treated mice were partially rescued for hypomyelination (Figure 6). However, immunohistochemistry against NeuN showed no differences in the neuronal count between the different groups, thus discarding significant neuronal loss (Figure S4).

Exposure to an HLD at this early stage of development has lethal consequences in the *Gcdh* KO mouse model.¹³ Under our conditions, close to 50% of *Gcdh* KO mice died after 10 days on an HLD regime, and only 40% of KO mice survived 5 months on an HLD. Strikingly, however, all KO-HLD mice that received a neonatal AAV-GCDH treatment survived. Visual observation of treated KO-HLD mice in their cages show spontaneous locomotor activity similar to WT animals. Further, all KO-HLD-treated mice remained phenotypically normal, with no signs of disease progression, during the 150-day follow-up (Figure 7). These results suggest that neonatal AAV-GCDH gene therapy is effective in the diet-induced GA1 preclinical model.

DISCUSSION

GA1 is currently treated by dietary lysine restriction and carnitine supplementation. Unfortunately, almost one-third of affected

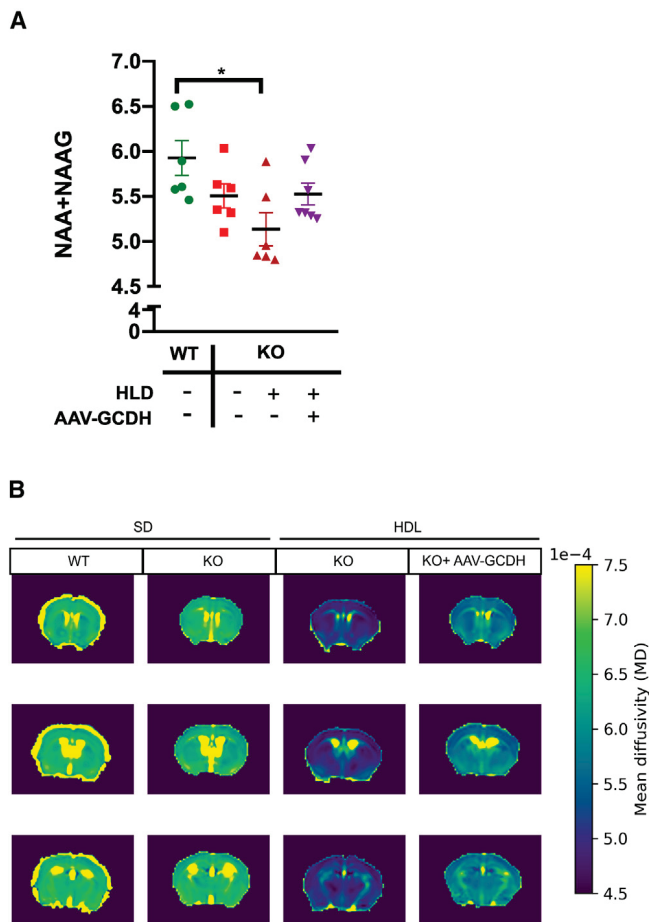


Figure 5. MRIs

One month-old WT or KO mice were fed a standard diet (SD) or HLD regime for 4 days and either treated with AAV-GCDH or saline; mice were then used for the MRI studies. (A) Proton MR spectroscopy imaging was performed in mice striatum ($n = 6-7$). Estimated concentration of NAA+NAAG are indicated. Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test. * $p < 0.05$. (B) Representative brain images of MD maps obtained from DWI.

children do not respond to therapy and experience striatal degeneration despite neonatal screening and careful clinical management.⁶⁻⁸ In the current study, we evaluated the potential of AAV-GCDH gene therapy in a preclinical mouse model of GA1. The application of the therapy faced the challenge to restore GCDH function in target organs and to protect the brain from injury, while using a minimally invasive approach. Our data show that a single systemic administration, through intravascular delivery of an AAV serotype 9 vector engineered to express the GCDH enzyme, ameliorated the striatal damage of *Gcdh* KO mice exposed to an HLD regime and rescued mice survival. These findings provide the foundation for translating AAV-GCDH gene therapy to GA1 patients.

We observed that the vector engineered with the CAG promoter was capable of inducing GCDH expression not only in the liver, but, importantly, also in key brain regions of the GA1 neuropathology.

When we used a virus with the weak promoter of PGK, we observed low GCDH expression in liver and no expression in brain after administration to young mice. This inefficiency was probably the result of the low promoter activity, together with the contribution of other distinct elements in the AAV expression cassettes, such as the polyadenylation signals SV40pA versus hGHpA and the presence of the Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element in the AAV-GCDH, a well-known element that stimulates transgene expression.²⁵ The low GCDH expression observed in brain even after AAV-GCDH administration was most probably related to the limited transduction of the CNS by AAV9 in young adults, as compared with the widespread effect in neonates.²¹ In fact, even with the use of a strong CAG promoter, only low levels of expression were achieved in the striatum of young adult mice, whereas neonatal administration of the virus at an equivalent viral dose (7.5×10^{12} vg/kg) displayed superior GCDH levels in the striatum. At a higher dose (of 5×10^{13} vg/kg), the AAV-GCDH resulted in GCDH expression that was superior to that of WT animals. Interestingly, the virus with the PGK promoter showed some expression in brain when delivered neonatally at the highest dose, but at low levels (Figure S5). Even though high levels of striatal GCDH expression were achieved when the administered dose was 6.6-fold higher in neonatal mice as compared with young mice, the quantification of viral genomes at 1 month after AAV-GCDH delivery resulted in at least 40-fold more viral particles in the striatum after neonatal injection than after young mouse administration (Figure S6), showing that this delivery strategy has increased striatal transduction. Moreover, the fact that neonatal delivery of AAV9 vectors transduced both neuronal and glial cells favors neonatal delivery, since GA1 neurons and astrocytes display vulnerabilities to the accumulated metabolites.^{21,26,27}

Neonatal AAV-GCDH administration prevented the accumulation of GA, 3-OHGA, and C5DC in the striatum of *Gcdh* KO-HLD mice after 1 month of treatment, as well as at 6 months after treatment after chronic HLD exposure. However, under a standard diet regime, few metabolites showed decreased content, suggesting that the AAV-GCDH therapy is insufficient to decrease the already accumulated metabolites, but is efficient in preventing their induction under HLD. Feeding the KO mice an HLD regime provoked biochemical and neuropathological alterations that highly resemble the encephalopathic crises that occur in individuals with GA1. Increased levels of GA and 3-OHGA are believed to trigger the striatal damage. In fact, it has been proposed that intracerebral *de novo* synthesis, and subsequent trapping of these metabolites, are the origin of their accumulation in the CNS of GA1 individuals.²⁸ Several authors have shown that there is limited flux of GA and 3-OHGA metabolites across the blood-brain barrier.^{28,29} However, recent data have challenged this view; for instance, in a series of transplantation experiments, Barzi and collaborators³⁰ show that alterations in hepatic lysine catabolism affect the accumulation of toxic metabolites in the brain of *Gcdh* KO mice, and that restoring the liver GCDH in these mice via an AAV vector expressing GCDH from a liver-specific promoter partially rescued the phenotype. However, very high doses (of approximately 15 times higher than the ones used here) were needed to observe such benefits.³⁰

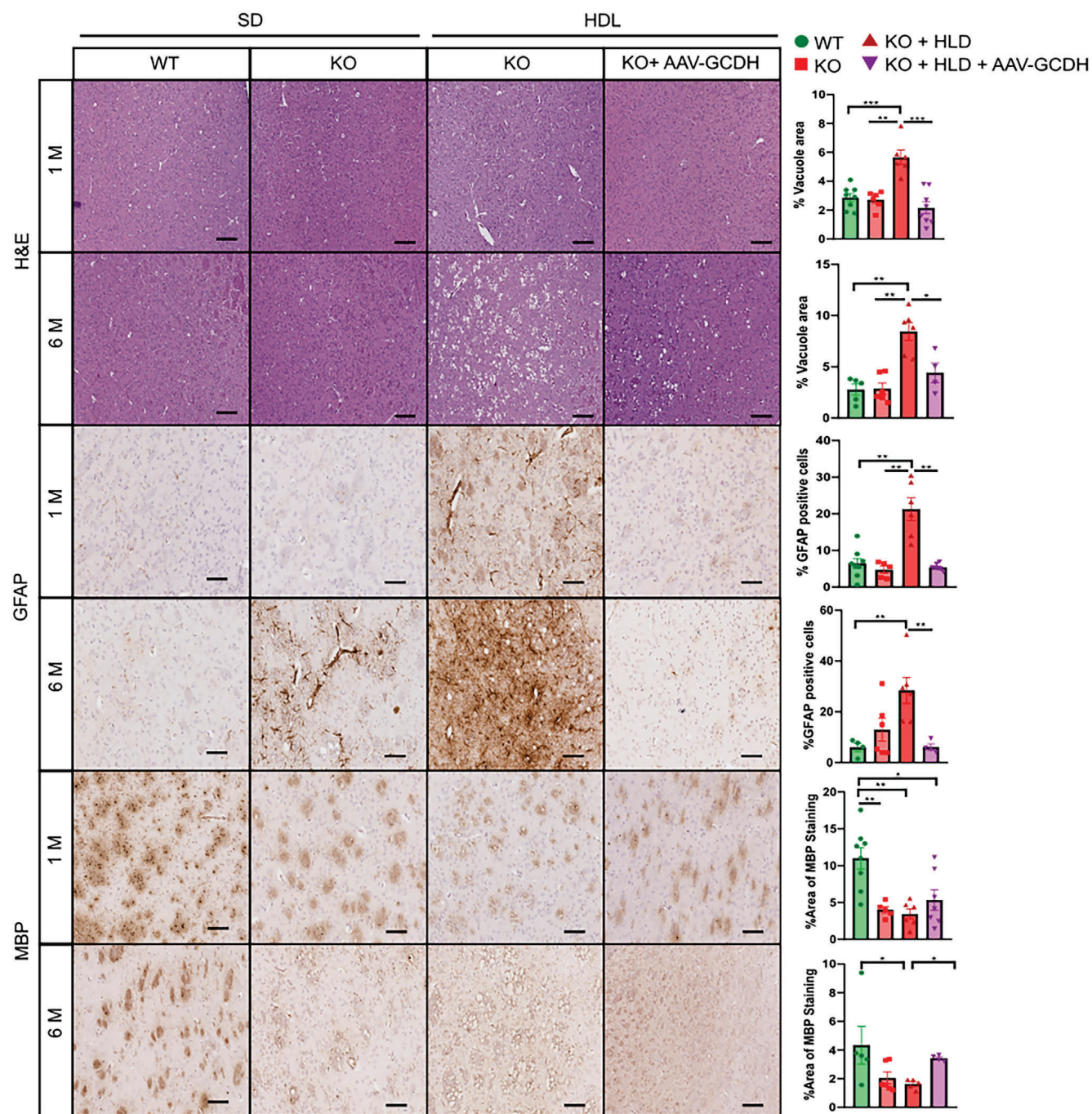


Figure 6. Neonatal AAV-GCDH ameliorates striatal injury

Immunohistochemical analysis of striatum alterations in the indicated groups of mice. Hematoxylin and eosin staining showing progressive vacuolation in KO-HLD mice. Scale bar, 50 μ m, and GFAP, glial marker; scale bar, 100 μ m, and MBP, myelin marker. Quantification was performed on histology images with 1 section/mouse, digitalized with a ScanScope slide scanner, and analyzed with QuPath 0.3.0 software. Results are presented as percentage of vacuole area, GFAP-positive cells, or area of MBP staining. Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Significance was assessed using a two-tailed Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

We also observed some contribution of liver correction when AAV-GCDH was administered to young adult (4-week-old) mice, and sustained GCDH expression was achieved for at least 5 months,

improving the metabolite content both in the liver and in circulation (Figure S7). However, this was not observed when the therapy was given in the neonatal period, probably because the dilution effect

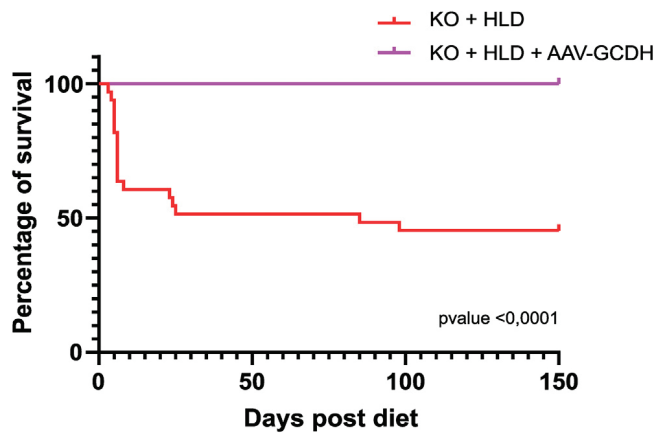


Figure 7. Neonatal AAV-GCDH administration to KO-HLD mice results in normal lifespan

Follow-up of 150 days for mice survival in *Gcdh* KO mice treated ($n = 25$) or not ($n = 33$) with AAV-GCDH and exposed to HLD at weaning. p value was calculated by log rank test (Mantle-Cox).

related to organ growth hindered a full recovery of the GCDH expression and the metabolite reduction after 6 months of treatment. Thus, it could be speculated that, below a certain threshold of liver GCDH activity, local GCDH delivery is required to prevent an increase of metabolites in the striatum and to protect the brain from damage, as our data show after neonatal delivery. This is in line with the reported benefits of delivering GCDH to the central nervous system.³¹

The mechanisms by which GA and 3-OHGA generate brain damage are not fully understood. Some studies emphasize disturbances in the glutamatergic and GABAergic neurotransmission, facilitating excitotoxic mechanisms.^{14,15} Moreover, oxidative stress and mitochondrial dysfunction also contribute to the pathology.³² The main alterations associated with striatal injury in GA1 individuals are reactive astrogliosis, neuronal loss, and changes in white matter.^{33,34} Our results show that *Gcdh* KO mice exposed to an HLD had a significantly lower content of NAA+NAAG metabolites in the striatum, which can be partially rescued by prior AAV-GCDH therapy. Decreased levels of NAA have also been observed in GA1 individuals^{35,36} and have been associated with neuronal loss or neuronal distress. However, the absence of significant differences in the NeuN staining between all the experimental settings in this study discards neuronal death in the striatum. Previous reports have also shown absence of neuronal loss in the *Gcdh* KO mice, which could be attributed to low neuronal vulnerability of these mice to neurotoxic metabolites.^{11,24} However, decreases in NAA levels may reflect impaired mitochondrial function, suggesting neuronal dysfunction.³⁷ Nevertheless, we observed severe striatal damage with a strong astrogliosis in the *Gcdh* KO animals that progressed with age and with HLD feeding, which could however be rescued by the therapy.

An increased glial immunoreactivity when exposed to an HLD has been associated with increased GA and 3-OHGA concentrations, causing oxidative stress.²⁶ In line with previous reports, our data

also showed strong vacuolation inside the axonal packages with decreased myelinated areas.^{11,13,24} We also observed a progression of the lesions after chronic exposure to HLD, with major alterations after 5 months of HLD. Notably, a remarkable improvement in the neuropathology was observed at 1 month after therapy. Partial rescue was also observed in mice that developed a highly severe phenotype induced by 5 months of HLD exposure. Alterations in myelination have been proposed to alter synaptogenesis, and the rescue of hypomyelination reverses synaptic deficits.³⁸ Thus, we could speculate that protecting from demyelination with the AAV-GCDH treatment would lead to a recovery of neuronal function. In fact, our MRI findings confirmed the rescue of the neuronal damage and white matter alterations. These results support the view that neonatal delivery of AAV-GCDH provide neuroprotection to HLD-induced striatal injury in *Gcdh* KO mice, and that the amelioration of the phenotype leads to the survival of all treated KO mice.

Our data highlight the considerable therapeutic potential AAV-GCDH gene therapy for the treatment of individuals with GA1. We propose a noninvasive vector delivery approach with high efficacy that, when administered to pediatric patients, could potentially protect them from developing acute encephalopathic crises.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid design and AAV vector generation

To generate the pAAV-CAG-GCDH, the GCDH cDNA (Harvard Institute of Proteomics, HsCD00002837) was cloned into the pAAV-CA (Plasmid # 69616, Addgene), under the control of the ubiquitous CAG promoter (chimeric promoter with the CMV enhancer and the CAG). To generate the pAAV-PGK-GCDH, the human PGK promoter (kindly provided by JC: Segovia), the SV40 polyA (pCMV β , Clontech) and the GCDH cDNA were cloned in the NOT I site of the pAAV-MCS (Agilent Technologies). AAV vectors were produced according to standard procedures at the Viral Vector Production Unit, Autonomous University of Barcelona.

Western blot analysis

Total protein extracts were obtained using lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, and 20% glycerol) containing 1% Complete Mini Protease Inhibitor (Roche). Lysates were boiled for 10 min at 98°C and centrifuged 5 min at 16,000 $\times g$. Protein concentration was determined by BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Protein samples were resolved in 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes by standard methods. Membranes were blocked with TBS-Tween 10% milk (1 h at room temperature), immunoblotted with the corresponding antibody (anti-GCDH, AV43559, Sigma-Aldrich; or anti-GAPDH, ABS16, Sigma-Aldrich) diluted in TBS-Tween 1% milk, rinsed with TBS-Tween, and incubated with a polyclonal goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody (1/2,000 in TBS-Tween 1% milk, 1 h at room temperature). Antibody labeling was detected using the ECL Amer-sham Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences).

GCDH in gel activity

GCDH activity was analyzed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis using an adaptation of the originally described methodology.³⁹ Briefly, liver and striatum from WT and GCDH KO mice were Dounce homogenized (20 strokes) in lysis buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, and 0.1 mM EDTA) on ice. Tissue homogenates were centrifuged twice at $650\times g$ for 20 min at 4°C to remove cell debris and nuclei. Protein concentrations were determined using a BCA assay. Mitochondria-enriched fractions were obtained from 1,500 µg of liver protein, or from 1,000 µg of striatum protein, by centrifugation ($10,000\times g$ 10 min at 4°C). Samples were solubilized in 50 mM Bis-Tris, 0.5 M EDTA, 750 mM aminocaproic acid in the presence of 2% N-dodecyl-beta-maltoside, loaded onto 4%–20% polyacrylamide gradient gels, and electrophoresed in non-denaturing conditions. GCDH activity was detected by incubating the gel in an activity buffer (50 mM phosphate buffer, 200 µM glutaryl-CoA, 1.5 µM FAD, and 2 mg/mL NBT) at 37°C overnight.

Biochemical analysis

Cell extracts were obtained as described above. C5DC were extracted from cell extracts or serum samples with an organic solvent containing deuterated C5DC used as internal standard (NeoBase 1 kit, PerkinElmer). The extracted product was dried under nitrogen and reconstituted in methanol/H₂O (75/25). For neuronal tissue, the dried extracted product was derivatized with n-butanol/HCl 3N, dried under nitrogen and reconstituted in methanol/H₂O (75/25). The analysis was then performed with direct infusion using the mobile phase and chromatographic conditions as manufacture description in Neobase 1 kit and in positive MRM mode using an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (I-Class ACQUITY UPLC system; XevoTQD). Results were quantified using Neolynx Software (Waters).

For GA and 3-OHGA analysis, an aqueous solution containing the deuterium-labeled internal standards GA-d4 and 3-OH-GA-d5 was added to the homogenized striatum samples. Compounds were extracted using an Oasis HLB 96-well plate (60 mg sorbent) and eluted using an acetonitrile/methanol (90/10) phase, after formic acid at 0.4% solution was added to facilitate ionization. Chromatographic separation was done with an ACQUITY Premier BEH C18 Column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) and analyzed in negative MRM mode by H-Class ACQUITY UPLC system-XevoTQD. The flow rate was set to 320 µL min⁻¹ using a binary mixture of solvent A (water with 0.1% formic acid) and solvent B (methanol with 0.1% formic acid). Values were quantified with Targetlynx Software (Waters) using a calibration curve and normalized for protein content.

Animal procedures

Gcdh^{-/-} KO mice were purchased from the Mutant Mouse Resource and Research Center strain ID 34368 and maintained in a specific pathogen-free animal facility in a 12-h dark-light cycle. Mice were fed ad libitum with a standard diet or a HL containing 4.7% Lys, as stated. Animals were placed on an HLD as 3-week-old weanlings or

5-week-old young adults. Mice were sacrificed at the age of 1, 2, or 6 months.

Gcdh KO mice were injected in the temporal vein (neonatal) or tail vein (4-week-old young adults) with 1×10^{11} or 1.5×10^{10} viral genomes of AAV9-GCDH or AAV9-PGK-GCDH. Based on weight, neonatal mice received a single dose of 5×10^{13} vg/kg or 7.5×10^{12} vg/kg, and young adults received 7.5×10^{12} vg/kg. Neonatal injections were performed following the previously described protocol.⁴⁰ Briefly, pups at P1 or P2 were placed on wet ice for 30–60 s to anesthetize them and then placed under a stereoscope. The temporal vein was identified, the needle containing the virus was inserted into the vein, and the viral content was released. Pups were then coated with bedding to ensure acceptance by the mothers and placed back into the home cage.

Animal procedures met the guidelines of European Community Directive 86/609/EEC and the local legislation (Decret 214/1997 of 20 July by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya) under the approval of the Experimental Animal and Ethical Committee of the University of Barcelona.

Histological preparation and immunohistochemical analysis

Mice were transcardially perfused with 1% PBS followed by 4% paraformaldehyde. Brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C and embedded in paraffin. Serial 6 µm brain coronal sections were collected on glass slides. Sections were processed for antigen retrieval in citrate buffer (Citrate Buffer 10× pH 6.0 1, Sigma-Aldrich) at 100°C (boiling point) for 5 min in a pressure cooker.

Sections were treated with a blocking solution (PBS 1×, 10% FBS, 1% BSA, 0.3% Triton X-100) for 1.5 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti-GFAP, G3893, Sigma-Aldrich; Anti-NeuN, clone A60, Sigma-Aldrich and anti-MBP, clone SMI 94, Biolegend) diluted in PBS with 0.1% BSA. Endogenous peroxidase was blocked with Dual Endogenous Enzyme Block (Dako) for 10 min at room temperature. The reaction was developed using Dako EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako), and tissues were counterstained with Harris hematoxylin (Panreac). Stained sections were visualized with an Olympus BX51 vertical microscope and digitalized with a ScanScope slide scanner and analyzed with QuPath 0.3.0 software.

MRI studies

MRI experiments were performed in a cohort of 24 mice (12 female and 12 male) distributed into 4 experimental groups: WT on a standard diet, $n = 6$; KO on a standard diet and no treatment, $n = 6$; KO on an HLD but no treatment, $n = 6$; and KO on an HLD and with treatment, $n = 6$.

MRI acquisitions were performed on a 7.0T BioSpec 70/30 horizontal animal scanner (Bruker BioSpin), equipped with an actively shielded gradient system (400 mT/m, 12-cm inner diameter). The

receiver coil was a one-channel phased-array surface coil for the mouse brain. The acquisition protocol included MRS and diffusion-weighted imaging (DWI). Three-dimensional localizer scans were used to ensure the accurate position of the head at the isocenter of the magnet. MRS in a voxel placed located in striatum was acquired using PRESS (voxel size 5.4 μ L, repetition time [TR] = 5,000 ms, echo time [TE] = 12 ms, 256 averages and partial water suppression using VAPOR). Voxel position was based on reference T2-weighted images in axial, sagittal and coronal orientation acquired with a RARE sequence (voxel size = $0.08 \times 0.08 \times 0.16$ mm³, TR = 2,300 ms, TE = 11 ms, RARE factor = 8). A non-suppressed reference water signal was also acquired in the same voxel as reference for absolute metabolite quantification. DWI were acquired with a two-shell scheme including 6 gradient directions acquired with b-value = 500 s/mm² and 30 gradient directions with b = 1,000 s/mm² and 4 baseline images acquired without diffusion weighting. Other parameters were TR = 4,000 ms, TE = 27.7 ms, and voxel size = $0.21 \times 0.21 \times 0.5$ mm³.

Metabolite concentration was estimated using LC-Model.⁴¹ To ensure quality of the estimations, spectrum was only included if full-width at half-maximum was lower than 0.08 ppm and signal-to-noise ratio was greater than 10. Metabolites quantified with relative Cramér-Rao lower bounds of higher than 20% were discarded.

DWI were processed to extract MD maps using dipy.⁴² Processing includes eddy current correction, denoising and unbias, registration to T2 to correct for EPI distortion and fitting of diffusion tensor (DT) model. Fractional Anisotropy (FA) and MD at each voxel were obtained from the estimated DT. Voxel-based statistical analysis was performed using FMRIB Software Library (FSL) randomize using threshold-free cluster enhancement (TFCE) and family-wise error to correct for multiple comparisons.⁴³

Viral genome quantification

Genomic DNA was purified from frozen tissue using standard procedures. Viral genomes were analyzed by Real Time qPCR, on a QuantStudio7 System (Applied Biosystems), using SYBR Green I Master plus mix (Roche Diagnostics) and the primer set specific for the AAV2 ITR genome sequences (Fwd ITR primer, 5'-GG AACCCCTAGTGATGGAGTT and Rev ITR primer, 5'-CGGC CTCAGTGAGCGA).⁴⁴ Viral genomes were quantified by interpolation in a standard curve of pAAV-GCDH DNA dilutions in a background of genomic DNA.

Statistical analysis

Experimental data are represented by the mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed on GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad Software). Statistical differences were evaluated using a 2-tailed non-parametric Mann-Whitney test. A *p* value of <0.05 was taken as the level of significance. Mice survival was analyzed by the Kaplan-Meier method and evaluated with a log-rank (Mantel-Cox) test.

DATA AND CODE AVAILABILITY

Data are available within the published article and supplemental files. Additional data are available from corresponding author on reasonable request.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101276>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Javier Lopez for technical assistance on mouse brain MRI studies. We are indebted to the Biobank and Image core facilities of IDIBAPS for technical help and to the Unitat d'Experimentació Animal del Campus Clínic – CCiTUB for animal studies. This work was developed at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain. A.M.-B. is the recipient of a PIF-Salut predoctoral contract from Generalitat de Catalunya, Spain. This work was supported by grants to CF from the CIVP19A5949-Fundación Ramón Areces, ACCI-CIBERER, and PID2020-119692RB-C22 Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, with partial support from Fundacio La Caixa, the Generalitat de Catalunya SGR21/01169 and from ISCIII RICORS RD21/0017/0012. We also acknowledge all members of the CHARLIE Consortium (www.charlie.science) for their helpful discussions. This project also received support from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) AC20/00088 under the frame of E-Rare-3, the ERA-Net for Research on Rare Diseases, EJPRD (grant nr: 825575). CIBERER is an initiative of the ISCIII. We also acknowledge the support of CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. Graphical abstract was created with [Biorender.com](https://biorender.com).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M.-B. designed and performed most of the experiments and prepared the figures; E.S.-B. and J.G.-V. performed the metabolite analysis; S.G.-S. contributed to the AAV design and generation; E.M.-M. performed MRI acquisition and analysis; E.S.-B. and F.T. performed GCDH enzyme activity assays; A.R. provided GA1 pathology expertise and contributed to manuscript writing; M.J.B. and M.A. helped with immunostainings and interpretation of CNS pathology; C.F. coordinated the study and wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Goodman, S.I., and Kohlhoff, J.G. (1975). Glutaric aciduria: inherited deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase activity. *Biochem. Med.* 13, 138–140. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(75\)90149-0](https://doi.org/10.1016/0006-2944(75)90149-0).
- Boy, N., Mühlhausen, C., Maier, E.M., Ballhausen, D., Baumgartner, M.R., Beblo, S., Burgard, P., Chapman, K.A., Dobbelaere, D., Heringer-Seifert, J., et al. (2023). Recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type 1: Third revision. *J. Inher. Metab. Dis.* 46, 482–519. <https://doi.org/10.1002/jimd.12566>.
- Schuurmans, I.M.E., Dimitrov, B., Schröter, J., Ribes, A., de la Fuente, R.P., Zamora, B., van Karnebeek, C.D.M., Kölker, S., and Garanto, A. (2023). Exploring

- genotype-phenotype correlations in glutaric aciduria type I. *J. Inherit. Metab. Dis.* 46, 371–390. <https://doi.org/10.1002/jimd.12608>.
4. Busquets, C., Merinero, B., Christensen, E., Gelpí, J.L., Campistol, J., Pineda, M., Fernández-Alvarez, E., Prats, J.M., Sans, A., Arteaga, R., et al. (2000). Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatr. Res.* 48, 315–322. <https://doi.org/10.1203/00006450-200009000-00009>.
 5. Garbade, S.F., Greenberg, C.R., Demirkol, M., Gökçay, G., Ribes, A., Campistol, J., Burlina, A.B., Burgard, P., and Kölker, S. (2014). Unravelling the complex MRI pattern in glutaric aciduria type I using statistical models—a cohort study in 180 patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 763–773. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9676-9>.
 6. Kyllerman, M., Skjeldal, O., Christensen, E., Hagberg, G., Holme, E., Lönnquist, T., Skov, L., Rotwelt, T., and von Döbeln, U. (2004). Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type I. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 8, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2003.12.007>.
 7. Kölker, S., Garbade, S.F., Greenberg, C.R., Leonard, J.V., Saudubray, J.-M., Ribes, A., Kalkanoglu, H.S., Lund, A.M., Merinero, B., Wajner, M., et al. (2006). Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* 59, 840–847. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000219387.79887.86>.
 8. Strauss, K.A., Williams, K.B., Carson, V.J., Poskitt, L., Bowser, L.E., Young, M., Robinson, D.L., Hendrickson, C., Beiler, K., Taylor, C.M., et al. (2020). Glutaric acidemia type I: Treatment and outcome of 168 patients over three decades. *Mol. Genet. Metabol.* 131, 325–340. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.007>.
 9. Boy, N., Mengler, K., Heringer-Seifert, J., Hoffmann, G.F., Garbade, S.F., and Kölker, S. (2021). Impact of newborn screening and quality of therapy on the neurological outcome in glutaric aciduria type I: a meta-analysis. *Genet. Med.* 23, 13–21. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-00971-4>.
 10. Kölker, S., Boy, S.P.N., Heringer, J., Müller, E., Maier, E.M., Ensenaer, R., Mühlhausen, C., Schlune, A., Greenberg, C.R., Koeller, D.M., et al. (2012). Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I - A decade of experience. *Mol. Genet. Metabol.* 107, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.021>.
 11. Koeller, D.M., Woontner, M., Crnic, L.S., Kleinschmidt-DeMasters, B., Stephens, J., Hunt, E.L., and Goodman, S.I. (2002). Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* 11, 347–357. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.4.347>.
 12. Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Housman, C., LaNoue, K., O'Callaghan, J.P., Simpson, I., Woontner, M., Goodman, S.I., Connor, J.R., Jacobs, R.E., and Cheng, K.C. (2007). Mechanism of age-dependent susceptibility and novel treatment strategy in glutaric acidemia type I. *J. Clin. Invest.* 117, 3258–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI31617>.
 13. Zinnanti, W.J., Lazovic, J., Wolpert, E.B., Antonetti, D.A., Smith, M.B., Connor, J.R., Woontner, M., Goodman, S.I., and Cheng, K.C. (2006). A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* 129, 899–910. <https://doi.org/10.1093/brain/awl009>.
 14. Rodrigues, M.D.N., Seminotti, B., Amaral, A.U., Leipnitz, G., Goodman, S.I., Woontner, M., de Souza, D.O.G., and Wajner, M. (2015). Experimental evidence that overexpression of NR2B glutamate receptor subunit is associated with brain vacuolation in adult glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice: A potential role for glutamatergic-induced excitotoxicity in GA I neuropathology. *J. Neurol. Sci.* 359, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.10.043>.
 15. Busanello, E.N.B., Fernandes, C.G., Martell, R.V., Lobato, V.G.A., Goodman, S., Woontner, M., de Souza, D.O.G., and Wajner, M. (2014). Disturbance of the glutamatergic system by glutaric acid in striatum and cerebral cortex of glutaryl-CoA dehydrogenase-deficient knockout mice: possible implications for the neuropathology of glutaric acidemia type I. *J. Neurol. Sci.* 346, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.09.003>.
 16. Sauer, S.W., Opp, S., Hoffmann, G.F., Koeller, D.M., Okun, J.G., and Kölker, S. (2011). Therapeutic modulation of cerebral L-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I. *Brain* 134, 157–170. <https://doi.org/10.1093/brain/awq269>.
 17. Kölker, S., Christensen, E., Leonard, J.V., Greenberg, C.R., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Dixon, M., Duran, M., Goodman, S.I., Koeller, D.M., et al. (2007). Guideline for the diagnosis and management of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I). *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 5–22. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0451-4>.
 18. Xu, L., Daly, T., Gao, C., Flotte, T.R., Song, S., Byrne, B.J., Sands, M.S., and Parker Ponder, K. (2001). CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum. Gene Ther.* 12, 563–573. <https://doi.org/10.1089/104303401300042500>.
 19. Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruza, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J. Clin. Invest.* 123, 3254–3271. <https://doi.org/10.1172/JCI66778>.
 20. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.76>.
 21. Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotechnol.* 27, 59–65. <https://doi.org/10.1038/NBT.1515>.
 22. Zong, W., Liu, S., Wang, X., Zhang, J., Zhang, T., Liu, Z., Wang, D., Zhang, A., Zhu, M., and Gao, J. (2015). Trio gene is required for mouse learning ability. *Brain Res.* 1608, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.040>.
 23. Gong, T., Zhang, C., Ni, X., Li, X., Li, J., Liu, M., Zhan, D., Xia, X., Song, L., Zhou, Q., et al. (2020). A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse liver. *Genome Res.* 30, 263–275. <https://doi.org/10.1101/GR.253328.119>.
 24. Olivera-Bravo, S., Seminotti, B., Isasi, E., Ribeiro, C.A., Leipnitz, G., Woontner, M., Goodman, S.I., Souza, D., Barbeito, L., and Wajner, M. (2019). Long Lasting High Lysine Diet Aggravates White Matter Injury in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh^{-/-}) Mice. *Mol. Neurobiol.* 56, 648–657. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1077-x>.
 25. Loeb, J.E., Cordier, W.S., Harris, M.E., Weitzman, M.D., and Hope, T.J. (1999). 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. <https://doi.org/10.1089/10430349950016942>.
 26. Olivera-Bravo, S., Ribeiro, C.A.J., Isasi, E., Trias, E., Leipnitz, G., Díaz-Amarilla, P., Woontner, M., Beck, C., Goodman, S.I., Souza, D., et al. (2015). Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh^{-/-} mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4504–4515. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv175>.
 27. Mateu-Bosch, A., Segur-Bailach, E., García-Villoria, J., Gea-Sorlí, S., Ruiz, I., del Rey, J., Camps, J., Guitart-Mampel, M., Garrabou, G., Tort, F., et al. (2024). Modeling Glutaric Aciduria Type I in human neuroblastoma cells recapitulates neuronal damage that can be rescued by gene replacement. *Gene Ther.* 31, 12–18. <https://doi.org/10.1038/S41434-023-00428-8>.
 28. Sauer, S.W., Okun, J.G., Fricker, G., Mahringer, A., Müller, I., Crnic, L.R., Mühlhausen, C., Hoffmann, G.F., Hörster, F., Goodman, S.I., et al. (2006). Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurochem.* 97, 899–910. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03813.x>.
 29. Keyser, B., Glatzel, M., Stellmer, F., Kortmann, B., Lukacs, Z., Kölker, S., Sauer, S.W., Muschol, N., Herdering, W., Thiem, J., et al. (2008). Transport and distribution of 3-hydroxyglutaric acid before and during induced encephalopathic crises in a mouse model of glutaric aciduria type I. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2008.02.008>.
 30. Barzi, M., Johnson, C.G., Chen, T., Rodriguiz, R.M., Hemmingsen, M., Gonzalez, T.J., Rosales, A., Beasley, J., Peck, C.K., Ma, Y., et al. (2023). Rescue of glutaric aciduria type I in mice by liver-directed therapies. *Sci. Transl. Med.* 15, ead4086. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adf4086>.
 31. Guo, L., Li, Z., Li, Y., Qu, B., Jiao, G., Liang, C., Lu, Z., Wang, X.-G., Huang, C., Du, H., et al. (2022). Treatment of glutaric aciduria type I (GA-I) via intracerebroventricular delivery of GCDH. *Fundamental Research* 2, 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.08.013>.

32. Wajner, M., Amaral, A.U., Leipnitz, G., and Seminotti, B. (2019). Pathogenesis of brain damage in glutaric acidemia type I: Lessons from the genetic mice model. *Int. J. Dev. Neurosci.* 78, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.05.005>.
33. Funk, C.B.R., Prasad, A.N., Frosk, P., Sauer, S., Kölker, S., Greenberg, C.R., and Del Bigio, M.R. (2005). Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort. *Brain* 128, 711–722. <https://doi.org/10.1093/brain/awh401>.
34. Soffer, D., Amir, N., Elpeleg, O.N., Gomori, J.M., Shalev, R.S., and Gottschalk-Sabag, S. (1992). Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric acidemia. *J. Neurol. Sci.* 107, 199–204. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(92\)90289-w](https://doi.org/10.1016/0022-510x(92)90289-w).
35. Kurul, S., Cakmakci, H., and Dirik, E. (2004). Glutaric aciduria type 1: proton magnetic resonance spectroscopy findings. *Pediatr. Neurol.* 31, 228–231. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2004.02.009>.
36. Pérez-Dueñas, B., De La Osa, A., Capdevila, A., Navarro-Sastre, A., Leist, A., Ribes, A., García-Cazorla, A., Serrano, M., Pineda, M., and Campistol, J. (2009). Brain injury in glutaric aciduria type I: the value of functional techniques in magnetic resonance imaging. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 13, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2008.12.002>.
37. Barker, P.B. (2001). N-Acetyl Aspartate—A Neuronal Marker? *Ann. Neurol.* 49, 423–424. <https://doi.org/10.1002/ANA.90>.
38. Wang, F., Yang, Y.-J., Yang, N., Chen, X.-J., Huang, N.-X., Zhang, J., Wu, Y., Liu, Z., Gao, X., Li, T., et al. (2018). Enhancing Oligodendrocyte Myelination Rescues Synaptic Loss and Improves Functional Recovery after Chronic Hypoxia. *Neuron* 99, 689–701.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.017>.
39. Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>.
40. Gombash Lampe, S.E., Kaspar, B.K., and Foust, K.D. (2014). Intravenous injections in neonatal mice. *J. Vis. Exp.* e52037. <https://doi.org/10.3791/52037>.
41. Provencher, S.W. (1993). Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 30, 672–679. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910300604>.
42. Garyfallidis, E., Brett, M., Amirbekian, B., Rokem, A., van der Walt, S., Descoteaux, M., and Nimmo-Smith, I.; Dipy Contributors (2014). Dipy, a library for the analysis of diffusion MRI data. *Front. Neuroinf.* 8, 8. <https://doi.org/10.3389/fninf.2014.00008>.
43. Winkler, A.M., Ridgway, G.R., Webster, M.A., Smith, S.M., and Nichols, T.E. (2014). Permutation inference for the general linear model. *Neuroimage* 92, 381–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.01.060>.
44. Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., and Baiker, A. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum. Gene Ther. Methods* 23, 18–28. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2011.034>.