



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

## **Tesi Doctoral**

**Avenços en la teràpia gènica per al MNGIE amb  
vectors adenoassociats: validació en un model  
millorat de la malaltia i optimització de seqüència  
del gen terapèutic**

**Ferran Vila Julià**

Tesi adscrita al programa de Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina del  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat en el Laboratori de Patologia Neuromuscular i Mitocondrial  
de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron

Directors

**Dr. Ramon Martí Seves**

**Dr. Javier Torres Torronteras**

Tutora

**Dra. Anna Messeguer Navarro**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**2020**



## RESUM

El MNGIE (*Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy*) és una malaltia mitocondrial d'herència autosòmica recessiva causada per mutacions en el gen *TYMP*, que codifica l'enzim timidina fosforilasa (TP). La TP catalitza la degradació de timidina (dThd) i desoxiuridina (dUrd), i la seva absència en pacients causa l'acumulació sistèmica d'aquests metabòlits, tòxica per la funció mitocondrial. A dia d'avui les úniques teràpies efectives són el transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques i el transplantament de fetge. No obstant, els transplantaments estan limitats per la necessitat d'un donant compatible i tenen una taxa de mortalitat i morbiditat associada especialment elevada en pacients de MNGIE.

Per a superar aquests inconvenients, fa temps vam proposar la teràpia gènica mitjançant vectors adenoassociats (rAAV) dirigits al fetge com a alternativa terapèutica, i vam demostrar la seva viabilitat en el model animal de MNGIE, el ratolí doble *knockout* (dKO) *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>*. Però aquest model només presenta fenotip bioquímic, de manera que només vam poder demostrar la correcció d'aquest fenotip.

Al 2014 es va descriure que augmentant el desequilibri metabòlic mitjançant l'administració oral de dThd i dUrd al model dKO durant tota la seva vida provocava l'aparició d'alguns trets que reproduïen la simptomatologia clínica dels pacients.

En aquesta tesi hem estudiat l'ús de la teràpia gènica en aquest model millorat, mitjançant el tractament amb tres rAAVs que expressaven la seqüència codificant de *TYMP* sota el control de 3 promotors hepàtics a diferents dosis.

El tractament amb rAAV va incrementar l'activitat TP en fetge i va disminuir la concentració sistèmica de nucleòsids dels ratolins dKO, que sense tractament eren 30 vegades superiors als valors normals. A nivell fenotípic, en la majoria dels ratolins, el tractament també va prevenir l'increment del volum dels ventricles cerebrals i el deteriorament motor observats en els ratolins no tractats. Quan vam comparar els tres vectors utilitzats, el rAAV amb el promotor de l'alfa-1-antitripsina (AAT) va ser el més eficaç. Aquests resultats confirmen que la teràpia gènica mediada per rAAV dirigida al fetge restaura l'homeòstasi bioquímica i demostren la prevenció de l'aparició del fenotip clínic del model animal millorat de MNGIE.



Un altre aspecte important per a la translació de la teràpia a la pràctica clínica és optimitzar el vector per tal de reduir-ne la dosi efectiva. En aquest sentit, hem testat dues aproximacions: la modificació de la seqüència codificant (ADNc) del gen segons la freqüència d'ús de codó per a incrementar la seva expressió, i l'eliminació dels dinucleòtids CpG de l'ADNc del gen per a reduir la immunogenicitat del vector.

Vam dissenyar quatre seqüències optimitzades de l'ADNc de *TYMP* amb 4 algoritmes diferents. Vam generar vectors lentivirals per transduir 4 línies cel·lulars humanes i determinar l'eficiència d'expressió de cada seqüència comparada amb la seqüència salvatge, tenint en compte el grau d'activitat TP, el número de còpies del vector i els nivells relatius d'ARNm. De tots els experiments, només una seqüència optimitzada va millorar el grau d'expressió de *TYMP* respecte el de la seqüència salvatge en la línia cel·lular hepàtica Huh7.

Pel que fa a la reducció de la immunogenicitat del vector, vam eliminar els dinucleòtids CpG de les seqüències dissenyades i vam analitzar el grau d'expressió de *TYMP*. Només la seqüència salvatge sense dinucleòtids CpG es va acostar a l'expressió de la seqüència natural. Tot i que s'hi observa una reducció d'expressió aproximada del 20%, es compensa per l'avantatge que aporta en termes de reducció de la resposta immunològica de cara a l'ús clínic del vector.

En conclusió, entre les opcions testades, recomanem el rAAV que conté l'ADNc natural de *TYMP* sense dinucleòtids CpG sota la regulació del promotor AAT per a un ús eventual en la pràctica clínica.

# ABSTRACT

MNGIE (*Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy*) is an autosomal recessive disease caused by mutations in *TYMP*, which encodes for the enzyme thymidine phosphorylase (TP). TP catalyses the first step of the catabolism of the nucleosides thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd). The lack of TP activity causes systemic nucleoside accumulation which is toxic for mitochondrial function. Nowadays, the only available therapies for MNGIE are allogeneic hematopoietic stem cell transplantation or liver transplantation. However, these treatments are limited by the need of a compatible donor and are associated to high mortality and morbidity rates in MNGIE patients.

To overcome these limitations, our laboratory proposed adenoassociated virus (rAAV) mediated gene therapy targeted to the liver for MNGIE and demonstrated its feasibility in the *Tymp<sup>-/-</sup> Upp1<sup>-/-</sup>* (dKO) mouse model of the disease. However, dKO mice show biochemical phenotype only, therefore we could only demonstrate the efficacy of our approach at the biochemical level.

In 2014 it was reported that increasing the biochemical imbalances of the dKO model by chronic oral administration of dThd and dUrd to dKO mice over their entire life induced some features that recapitulate part of the clinical manifestations observed in patients.

In this thesis we have studied the effect of gene therapy in this enhanced model, by treating the animals with three rAAVs expressing the human *TYMP* coding sequence under the control of three different liver-specific promoters.

rAAV treatment increased liver TP activity and limited the systemic nucleoside concentration present in the dKO enhanced model, which was 30-fold higher as compared with non-exposed wild-type mice. AAV-treatment also prevented, in most animals, the enlarged brain ventricles and the motor impairment observed in the exposed dKO mice. When we compared the three promoters tested, the rAAV containing the AAT promoter showed the best efficacy. These results confirm that AAV-mediated gene therapy restores the biochemical homeostasis and demonstrate

that this treatment prevents the clinical phenotype developed by the enhanced murine model of MNGIE.

Another key point for the clinical translation of gene therapy is the optimization of the therapeutic gene expression to reduce the vector dose. For this reason, we tested two approaches: modification of the coding sequence of *TYMP* based on the codon use frequency to increase the expression of the gene, and CpG dinucleotide removal from the coding sequence to reduce immunogenicity of the vector.

We designed four different codon-optimized sequences of the *TYMP* coding sequence, using four different algorithms. We cloned each optimized sequence in a lentiviral vector and transduced 4 different human cell lines. We analysed the degree of expression achieved with each sequence, as compared with the non-optimized wild-type *TYMP* sequence through evaluation of TP activity, vector copy number, and mRNA levels in the cell lines. Among all the sequences studied, only one optimized sequence resulted in higher TP activity when expressed per vector copy number in the hepatic cell line Huh7.

To reduce the immunogenicity of the vector we removed the CpG dinucleotides from the wild-type coding *TYMP* sequence and two codon-optimized *TYMP* sequences. The wild-type sequence without CpG was the only one showing expression levels similar to those of the wild-type sequence. Even though the CpG free sequence shows a reduced expression of about 20% of that observed in the wild-type sequence, it is compensated by the advantages associated to the absence of CpG sites in terms of reduction of the immunological response when considering the vector for clinical use.

In conclusion, among the different options tested, we recommend the rAAV vector containing the wild-type coding *TYMP* CpG-free sequence under the control of the AAT promoter for its use in the clinical practice.

# ÍNDEX

1. Abreviacions .....	21
2. Introducció .....	27
2.1. MNGIE: Encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial .....	29
2.1.1. Història i quadre clínic .....	29
2.1.2. MNGIE com a malaltia mitocondrial .....	31
2.1.3. Causa genètica del MNGIE .....	33
2.1.4. Metabolisme de nucleòtids .....	34
2.1.5. Alteracions del metabolisme de nucleòtids en el MNGIE .....	37
2.1.6. Estratègies terapèutiques .....	39
2.1.7. Models animals del MNGIE .....	43
2.2. Teràpia gènica .....	45
2.2.1. Introducció a la teràpia gènica .....	45
2.2.2. Sistemes de transferència gènica .....	46
2.2.2.1. Vectors no virals .....	47
2.2.2.2. Vectors virals .....	48
2.2.2.2.1. Vectors basats en adenovirus .....	49
2.2.2.2.2. Vectors basats en herpesvirus .....	50
2.2.2.2.3. Vectors basats en poxvirus .....	50
2.2.2.2.4. Vectors retrovirals i lentivirals .....	51
2.2.2.2.5. Vectors adenoassociats .....	52
2.2.3. Estratègies de millora dels rAAV .....	60
2.2.3.1. Estratègies de millora fora de la resposta immunitària .....	61
2.2.3.1.1. Modificació de les ITRs: scAAV .....	61
2.2.3.1.2. Optimització del casset d'expressió .....	62

2.2.3.1.3.	Optimització de la seqüència codificant.....	63
2.2.3.1.4.	Increment de la capacitat d'empaquetament.....	67
2.2.3.1.5.	Optimització de la càpsida.....	67
2.2.3.1.6.	Optimització del procés de transducció.....	68
2.2.3.2.	Estratègies dins la resposta immunològica.....	68
2.2.3.2.1.	Evasió de la resposta immune innata.....	69
2.2.3.2.2.	Evasió de la resposta immune adaptativa.....	70
2.3.	MNGIE i teràpia gènica.....	71
2.3.1.	Teràpia gènica <i>ex vivo</i> amb un LV dirigit al teixit hematopoètic.....	72
2.3.2.	Teràpia gènica <i>in vivo</i> amb un rAAV dirigit al fetge.....	73
3.	Hipòtesis i objectius.....	75
3.1.	Hipòtesis.....	77
3.2.	Objectius.....	78
4.	Materials i mètodes.....	79
4.1.	Disseny experimental.....	81
4.1.1.	Teràpia gènica de ratolins sobreexposats a nucleòsids.....	81
4.1.2.	Disseny i anàlisi de seqüències optimitzades de l'ADNc de <i>TYMP</i> ....	83
4.2.	Metodologia general.....	85
4.2.1.	Extracció d'ADN.....	85
4.2.1.1.	Extracció d'ADN plasmídic per miniprep.....	85
4.2.1.2.	Extracció d'ADN plasmídic per maxiprep.....	86
4.2.1.3.	Extracció d'ADN total per fenol-cloroform.....	86
4.2.1.4.	Extracció d'ADN total per fenol-cloroform simplificat.....	87
4.2.1.5.	Extracció d'ADN total mitjançant un <i>kit</i> comercial.....	88
4.2.2.	Extracció d'ARN.....	88

4.2.2.1.	Extracció d'ARN mitjançant un <i>kit</i> comercial .....	88
4.2.2.2.	Extracció d'ARN mitjançant el reactiu TRIzol .....	88
4.2.3.	Quantificació d'àcids nucleics .....	89
4.2.3.1.	Anàlisi de la qualitat de l'ARN.....	89
4.2.4.	Quantificació de proteïnes .....	89
4.2.5.	Electroforesis en gels d'agarosa.....	90
4.3.	PCR quantitativa a temps real (qPCR) .....	90
4.3.1.	Determinació de número de còpies amb sondes <i>Taqman<sup>TM</sup></i> .....	90
4.3.2.	Estudis d'expressió gènica .....	94
4.4.	Proves bioquímiques.....	96
4.4.1.	Determinació dels nucleòsids dThd i dUrd .....	96
4.4.1.1.	Determinació de dThd i dUrd en plasma de ratolins .....	96
4.4.1.2.	Determinació de dThd i dUrd en teixits de ratolí .....	97
4.4.2.	Determinació d'activitat timidina fosforilasa .....	99
4.4.3.	Determinació de dNTPs mitocondrials .....	101
4.4.3.1.	Extracció de dNTPs mitocondrials.....	101
4.4.3.2.	Determinació enzimàtica de dNTPs .....	103
4.5.	Immunodetecció de proteïnes per Western-Blot .....	106
4.5.1.	Obtenció d'extractes proteics.....	106
4.5.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS i transferència.....	106
4.5.3.	Immunodetecció i revelat .....	108
4.6.	Cultius cel·lulars.....	109
4.6.1.	Condicions generals de cultiu i manteniment de línies cel·lulars .....	109
4.6.2.	Línies cel·lulars i medis.....	110
4.6.3.	Comptatge cel·lular .....	112

4.6.4.	Recol·lecció de cèl·lules .....	113
4.6.5.	Transducció de vectors lentivirals en línies cel·lulars .....	114
4.7.	Anàlisis histoquímiques .....	114
4.7.1.	Preparació mostres: "Swiss-Roll" .....	114
4.7.2.	Tinció tricromàtica de Masson .....	115
4.8.	Procediments d'experimentació animal .....	116
4.8.1.	Model de ratolí i condicions d'estabulació .....	116
4.8.2.	Genotipatge .....	116
4.8.2.1.	Amplificació del gen <i>Tymp</i> .....	116
4.8.2.2.	Amplificació del gen <i>Upp1</i> .....	118
4.8.3.	Injecció intravenosa de rAAV .....	119
4.8.4.	Extracció i processament de mostres sanguínies .....	119
4.8.4.1.	Estudis farmacocinètics .....	120
4.8.5.	Test Rotarod .....	120
4.8.6.	Ressonància magnètica de cervell .....	121
4.8.7.	Obtenció de teixits .....	122
4.9.	Mètodes d'optimització i clonatge .....	124
4.9.1.	Algoritmes d'optimització .....	124
4.9.2.	Obtenció de seqüències de l'ADNc de <i>TYMP</i> optimitzades .....	125
4.9.3.	Digestió dels vectors amb enzims de restricció .....	126
4.9.4.	Purificació de fragments d'ADN a partir de gel d'agarosa .....	128
4.9.5.	Desfosforilació i lligació de fragments d'ADN .....	128
4.9.6.	Transformació de cèl·lules competents .....	129
4.9.7.	Seqüenciació de fragments d'ADN .....	130
4.9.8.	Clonatge de vectors lentivirals .....	131

4.10.	Obtenció de vectors lentivirals .....	134
4.10.1.	Producció de vectors lentivirals .....	134
4.10.2.	Titulació de vectors lentivirals .....	135
4.10.2.1.	Citometria de flux .....	136
4.11.	Anàlisis estadístiques .....	137
5.	Resultats .....	139
5.1.	Validació del tractament amb rAAV per a la teràpia gènica del MNGIE en el model dKO millorat. ....	141
5.1.1.	Control de pes .....	141
5.1.2.	Estudi de supervivència .....	143
5.1.3.	Monitorització de la concentració de dThd i dUrd en plasma .....	145
5.1.3.1.	Farmacocinètica de dThd i dUrd .....	148
5.1.4.	Número de còpies del vector .....	154
5.1.5.	Activitat TP en fetge .....	155
5.1.6.	Activitat TP en teixits no hepàtics .....	160
5.1.6.1.	Cervell .....	161
5.1.6.2.	Intestí prim .....	162
5.1.6.3.	Múscul esquelètic .....	163
5.1.7.	Contingut de nucleòsids en teixits al final de l'estudi .....	164
5.1.7.1.	Concentració de dThd i dUrd en plasma .....	164
5.1.7.2.	Contingut de dThd i dUrd en fetge .....	165
5.1.7.3.	Contingut de dThd i dUrd en cervell .....	167
5.1.7.4.	Contingut de dThd i dUrd en intestí prim .....	168
5.1.8.	Contingut de dNTPs mitocondrials .....	170
5.1.8.1.	Fetge .....	170
5.1.8.2.	Cervell .....	173



5.1.9.	Número de còpies d'ADNmt.....	176
5.1.9.1.	Cervell .....	176
5.1.9.2.	Intestí prim .....	177
5.1.10.	Avaluació de la funció motora i la coordinació – Test Rotarod.....	178
5.1.11.	Ressonància magnètica de cervell .....	179
5.1.12.	Presència de col·lagen en la capa muscular intestinal .....	181
5.2.	Optimització de la seqüència codificant de <i>TYMP</i> .....	183
5.2.1.	Generació de les seqüències.....	183
5.2.2.	Construcció dels vectors .....	184
5.2.3.	Eficiència d'expressió de <i>TYMP</i> in vitro .....	185
5.2.3.1.	Resultats de l'optimització en la línia cel·lular HEK293T .....	185
5.2.3.2.	Resultats de l'optimització en la línia cel·lular Huh7.....	187
5.2.3.3.	Resultats de l'optimització en dues línies LCL derivades de pacients de MNGIE .....	189
5.2.4.	Eliminació de seqüències CpG .....	192
6.	Discussió .....	197
6.1.	Efecte de l'exposició a nucleòsids en el model dKO .....	200
6.2.	Teràpia gènica en el model dKO exposat.....	206
6.2.1.	Restauració de l'activitat TP en el model de ratolí.....	207
6.2.2.	Restauració de l'homeòstasi bioquímica .....	210
6.2.3.	Restitució del fenotip neuromuscular i radiològic.....	213
6.3.	Optimització de la seqüència codificant de <i>TYMP</i> .....	214
6.4.	Perspectiva de la teràpia gènica pel MNGIE en humans .....	218
7.	Conclusions .....	223
8.	Bibliografia .....	227
9.	Annex I .....	255

9.1. Seguiment de la concentració de dUrd en plasma .....	257
9.2. Seqüències codificants del gen <i>TYMP</i> modificades .....	259
10. Annex II - Publicació derivada de la tesi .....	267
11. Annex III - Altres publicacions .....	289



# ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 2.1.</b> Síntomes i signes associats al MNGIE .....	30
<b>Figura 2.2.</b> Reacció catalitzada per la timidina fosforilasa .....	33
<b>Figura 2.3.</b> Representació de l'estructura d'un nucleòtid .....	35
<b>Figura 2.4.</b> Esquema del metabolisme de nucleòtids per a la síntesi d'ADNmt.....	37
<b>Figura 2.5.</b> Cronologia de les estratègies terapèutiques proposades pel MNGIE ..	42
<b>Figura 2.6.</b> Número d'assajos clínics segons la indicació .....	46
<b>Figura 2.7.</b> Número d'assajos clínics segons el vector utilitzat .....	47
<b>Figura 2.8.</b> Genoma dels AAV .....	53
<b>Figura 2.9.</b> Transducció i cicle viral dels AAV .....	55
<b>Figura 2.10.</b> Síntesi de la segona cadena d'ADN en la infecció per AAV .....	56
<b>Figura 2.11.</b> Estratègies de millora dels rAAV.....	61
<b>Figura 2.12.</b> Mecanismes de modificació de la velocitat d'elongació de la traducció on estan implicats els ARNt.....	65
<b>Figura 2.13.</b> Resposta immunitària del hoste contra els rAAV .....	69
<b>Figura 4.1.</b> Representació esquemàtica dels rAAV .....	81
<b>Figura 4.2.</b> Representació esquemàtica del disseny de l'estudi de la teràpia gènica amb ratolins exposats a sobrecàrrega de dThd i dUrd. ....	83
<b>Figura 4.3.</b> Representació esquemàtica del disseny de l'estudi d'optimització de la seqüència codificant de TYMP.....	84
<b>Figura 4.4.</b> Cambra de Neubauer.....	112
<b>Figura 4.5.</b> Aparell de Rotarod.....	121
<b>Figura 4.6.</b> Clonatge de les seqüències de l'ADNc de TYMP modificades en el plasmidi p305 .....	133
<b>Figura 5.1.</b> Evolució del pes corporal amb l'edat .....	142

<b>Figura 5.2.</b> Pes corporal en ratolins al final de l'estudi .....	143
<b>Figura 5.3.</b> Supervivència dels ratolins.....	144
<b>Figura 5.4.</b> Presència de tumors en el moment del sacrifici.....	145
<b>Figura 5.5.</b> Seguiment de la concentració de dThd plasmàtica en ratolins no tractats.....	146
<b>Figura 5.6.</b> Seguiment de la concentració de dThd plasmàtica en ratolins dKO tractats amb rAAV .....	147
<b>Figura 5.7.</b> Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins no tractats amb rAAV ...	149
<b>Figura 5.8.</b> Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins tractats amb AAV-TBG.	150
<b>Figura 5.9.</b> Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins tractats amb AAV-AAT .	152
<b>Figura 5.10.</b> Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins tractats amb AAV-HLP	153
<b>Figura 5.11.</b> Comparació dels resultats de la farmacocinètica entre vectors .....	154
<b>Figura 5.12.</b> VCN en fetge de ratolins dKO exposats i tractats amb rAAV .....	155
<b>Figura 5.13.</b> Efecte de l'exposició a dThd i dUrd sobre l'activitat TP en fetge .....	156
<b>Figura 5.14.</b> Nivells relatius d'ARNm dels gens <i>Tymp</i> , <i>Upp1</i> i <i>Upp2</i> en ratolins no tractats.....	156
<b>Figura 5.15.</b> Detecció d'UP1 i $\alpha$ -tubulina per <i>western-blot</i> .....	157
<b>Figura 5.16.</b> Activitat TP en fetge .....	158
<b>Figura 5.17.</b> Valors d'activitat TP normalitzats pel VCN en fetge.....	159
<b>Figura 5.18.</b> Comparativa de l'eficiència de cada vector.....	160
<b>Figura 5.19.</b> Activitat TP en cervell .....	161
<b>Figura 5.20.</b> Activitat TP en intestí prim.....	162
<b>Figura 5.21.</b> Activitat TP en múscul esquelètic.....	163
<b>Figura 5.22.</b> Concentració de dThd i dUrd en plasma en ratolins .....	165
<b>Figura 5.23.</b> Contingut de dThd i dUrd en fetge .....	166

<b>Figura 5.24.</b> Contingut de dThd i dUrd en cervell.....	168
<b>Figura 5.25.</b> Contingut de dThd i dUrd en intestí prim .....	169
<b>Figura 5.26.</b> Contingut de dNTPs mitocondrials en fetge de ratolins no tractats ..	171
<b>Figura 5.27.</b> Contingut de dNTPs mitocondrials en fetge.....	172
<b>Figura 5.28.</b> Contingut de dNTPs mitocondrials en cervell de ratolins no tractats	173
<b>Figura 5.29.</b> Contingut de dNTPs mitocondrials en cervell .....	175
<b>Figura 5.30.</b> Número de còpies d'ADNmt en cervell .....	176
<b>Figura 5.31.</b> Número de còpies d'ADNmt en intestí prim .....	177
<b>Figura 5.32.</b> Funció motora i coordinació. ....	178
<b>Figura 5.33.</b> Imatge per ressonància magnètica de cervell.....	179
<b>Figura 5.34.</b> Quantificació del volum dels ventricles .....	180
<b>Figura 5.35.</b> Tinció tricròmica de Masson d'intestí prim .....	182
<b>Figura 5.36.</b> Clonatge de les seqüències optimitzades .....	184
<b>Figura 5.37.</b> Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular HEK293T .....	186
<b>Figura 5.38.</b> Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular Huh7 .....	188
<b>Figura 5.39.</b> Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular P1-LCL. ....	190
<b>Figura 5.40.</b> Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular P2-LCL .....	191
<b>Figura 5.41.</b> Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular Huh7 .....	194
<b>Figura 6.1.</b> Gen <i>Upp1</i> de ratolí .....	203
<b>Figura 9.1.</b> Seguiment de la concentració de dUrd plasmàtica.....	257
<b>Figura 9.2.</b> Seguiment de la concentració de dUrd plasmàtica.....	258



# ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 2.1.</b> Principals vectors virals i les seves característiques .....	48
<b>Taula 2.2.</b> Receptors, coreceptors i tropisme dels serotips naturals d'AAV .....	58
<b>Taula 2.3.</b> Ús de codó en les seqüències codificants en <i>Homo sapiens</i> .....	63
<b>Taula 4.1.</b> Grups d'animals de l'estudi .....	82
<b>Taula 4.2.</b> Sondes <i>Taqman<sup>TM</sup> MGB</i> utilitzades per a la determinació del número de còpies del vector lentiviral en cèl·lules.....	91
<b>Taula 4.3.</b> Composició de la reacció d'amplificació per a determinar el número de còpies del vector lentiviral .....	91
<b>Taula 4.4.</b> Sondes <i>Taqman<sup>TM</sup> MGB</i> utilitzades per a la determinació del número de còpies del rAAV per cèl·lula .....	92
<b>Taula 4.5.</b> Composició de la reacció d'amplificació per a determinar el número de còpies del rAAV .....	92
<b>Taula 4.6.</b> Composició de la reacció d'amplificació per a determinar el número de còpies d'ADNmt.....	93
<b>Taula 4.7.</b> Condicions de l'amplificació per qPCR .....	94
<b>Taula 4.8.</b> Composició de la mescla de reacció per al tractament amb DNAsa.....	94
<b>Taula 4.9.</b> Composició de la mescla de reacció per a la retrotranscripció .....	95
<b>Taula 4.10.</b> Sondes <i>Taqman<sup>TM</sup> MGB</i> utilitzades en estudis d'expressió gènica .....	96
<b>Taula 4.11.</b> Composició de la mescla de reacció per a la determinació de l'activitat TP .....	100
<b>Taula 4.12.</b> Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per a la determinació de dNTPs .....	104
<b>Taula 4.13.</b> Composició de la reacció de determinació de dNTPs .....	105
<b>Taula 4.14.</b> Composició del gel separador .....	107



<b>Taula 4.15.</b> Composició del gel concentrador .....	107
<b>Taula 4.16.</b> Anticossos primaris utilitzats .....	108
<b>Taula 4.17.</b> Composició del medi de cultiu de la línia cel·lular HEK293T .....	110
<b>Taula 4.18.</b> Composició del medi de cultiu de la línia cel·lular Huh7 .....	111
<b>Taula 4.19.</b> Composició del medi de cultiu de les línies cel·lulars LCL .....	111
<b>Taula 4.20.</b> Composició de la reacció de PCR per a l'amplificació del gen <i>Tymp</i> amb el kit <i>TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG Plus</i> .....	117
<b>Taula 4.21.</b> Condicions d'amplificació de la PCR .....	118
<b>Taula 4.22.</b> Criteris d'optimització de codons dels diversos algoritmes .....	125
<b>Taula 4.23.</b> Nomenclatura de les seqüències d'ADNc <i>TYMP</i> modificades i plasmidis resultants del clonatge .....	125
<b>Taula 4.24.</b> Composició de la reacció de restricció de pTYMP-OPT i pTYMP-NoCG amb <i>BamHI</i> .....	126
<b>Taula 4.25.</b> Composició de la reacció de restricció de p305 amb <i>BamHI</i> .....	127
<b>Taula 4.26.</b> Composició de la restricció de p305-OPT i p305-NoCG amb <i>BamHI</i> .....	127
<b>Taula 4.27.</b> Composició de la reacció de desfosforilació.....	128
<b>Taula 4.28.</b> Composició de la reacció de lligació.....	129
<b>Taula 4.29.</b> Encebadors utilitzats per la seqüenciació Sanger de fragments d'ADN .....	131
<b>Taula 4.30.</b> Composició de la mescla de transfecció.....	134
<b>Taula 4.31.</b> Mescles de transducció per la titulació de vectors lentivirals .....	136
<b>Taula 5.1.</b> Característiques principals de les seqüències optimitzades .....	183
<b>Taula 5.2.</b> Número de dinucleòtids CpG substituïts.....	193

# 1. ABREVIACIONES

---



A	Adenina
aa	Aminoàcids
AAT	Alfa-1-antitripsina
AAV	Virus adenoassociat
Ad	Adenovirus
ADNc	ADN codificant
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
AH SCT	Transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferència
AUC	Àrea sota la corba
C	Citosina
CAI	Índex d'adaptació de codó
CAPD	Diàlisi peritoneal ambulatoria continua
CNS	Sistema nerviós central
CTL	Resposta T citotòxica
dCK	Citidina quinasa
dCtd	Desoxicitidina
dGK	Guanosina quinasa
dKO	Doble <i>knock-out</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNDPs	Desoxiribonucleòsids difosfat
dNTPs	Desoxiribonucleòsids trifosfat
dThd	Timidina
dThd*	Timidina deuterada
dUrd	Desoxiuridina
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
EE-TP	Eritròcits amb timidina fosforilasa recombinant encapsulada

## | Abreviacions

eGFP	Proteïna verda fluorescent millorada
EMA	Agència Europea del Medicament
FBS	Sèrum fetal boví
G	Guanina
hPGK	Fosfoglicerat quinasa humana
HSV	Herpesvirus
IRES	Lloc intern d'entrada del ribosoma ( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
ITR	Seqüència terminal invertida ( <i>Inverted Terminal Repeat</i> )
kb	Kilobases
KO	<i>Knock-out</i>
LB	Luria Bertani
LCL	Línia cel·lular limfoblastoïde
LV	Vector lentiviral
miRNA	MicroRNA
MNGIE	Encefalopatia neurogastrointestinal mitocondrial
MOI	Multiplicitat d'infecció
MRI	Imatges obtingudes per ressonància magnètica nuclear
NDP	Nucleòsid difosfat
NMP	Nucleòsid monofosfat
NTP	Nucleòsid difosfat
OD600	Densitat òptica
OLT	Transplantament de fetge
ON	<i>Over-night</i> , Tota la nit
pb	Parells de bases
PAMPS	Patró molecular associat a patògens
PBS	Tampó fosfat salí
PEI	Polietilenimina
PMSF	Fenimetilsulfonil
rAAV	Vector adenoassociat

RNR	Ribonucleòtid reductasa
rpm	Revolucions per minut
qPCR	PCR quantitativa a temps real
scAAV	Vector adenoassociat auto-complementari ( <i>self-complementary</i> )
SDS	Dodecil sulfat
SIN	Vector lenviral auto-inactivat ( <i>Self-inactivated</i> )
siRNA	RNA petit d'interferència
T	Timina
TA	Temperatura ambient
TBE	Tampó Tris-borat i EDTA
TBG	Globulina fixadora de tiroxina
TK1	Timidina quinasa 1
TK2	Timidina quinasa 2
TL	Tampó de lisi
TP	Timidina fosforilasa
U	Uracil
UNG	Uracil-ADN glicosilasa
UP	Uridina fosforilasa
UPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
VCN	Número de còpies del vector
WPRE	Element regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis de la marmota
WT	<i>Wild-type</i>



## **2. INTRODUCCIÓ**

---





## 2.1. MNGIE: ENCEFALOMIOPATIA NEUROGASTROINTESTINAL MITOCONDRIAL

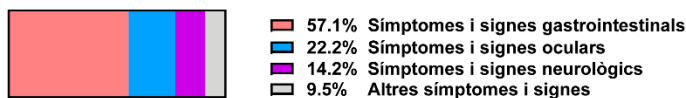
### 2.1.1. HISTÒRIA I QUADRE CLÍNIC

El MNGIE, de les sigles en anglès *Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy* (ORPHA:298; OMIM: 603041) és una malaltia minoritària d'herència autosòmica recessiva associada a defectes en la replicació i manteniment de l'ADN mitocondrial (ADNmt) [1].

El primer cas va ser descrit al 1976 per Okamura i col·laboradors com a una “Miopatia oculoesquelètica congènita amb mitocondris anormals al fetge i al múscul” [2]. Des de llavors, s'ha descrit en altres pacients com “miopatia mitocondrial amb polineuropatia sensoriomotora, oftalmoplegia i pseudo-obstrucció (MEPOP)” [3], “encefalopatia mioneuogastrointestinal (MNGIE)” [4], “polineuropatia, oftalmoplegia, leucoencefalopatia i pseudo-obstrucció intestinal (POLIP)” [5], “distròfia ocologastrointestinal muscular (OGIMD)” [6], fins que l'any 1994 Hirano i col·laboradors van proposar el nom MNGIE com a encefalomiopatia neuogastrointestinal mitocondrial per posar èmfasis en la deficiència mitocondrial [7].

Clínicament, el MNGIE és un desordre multisistèmic. Els pacients presenten símptomes gastrointestinals, dels quals el més comú és la dismotilitat gastrointestinal greu, que es pot manifestar com a suboclusió intestinal, nàusees, vòmits, borborigmes, dolor i distensió abdominal, disfàgia, restrenyiment, diarrea i peritonitis aguda deguda a perforació de l'intestí prim, i que contribueixen a una constitució corporal molt prima i fins i tot caquèxia extrema. També presenten símptomes i signes neuromusculars entre els que destaquen la leucoencefalopatia, la neuropatia perifèrica, ptosis, oftalmoplegia externa progressiva, o la pèrdua auditiva. Addicionalment, s'ha observat que els pacients de MNGIE poden presentar una ampla varietat d'alteracions metabòliques: hiperlactacidèmia derivada de la disfunció mitocondrial, esteatosi hepàtica que pot evolucionar cap a cirrosi, pancreatitis, diabetis de debut precoç, i un increment dels nivells de triglicèrids en plasma, entre altres (**Figura 2.1**) [1,7–14].

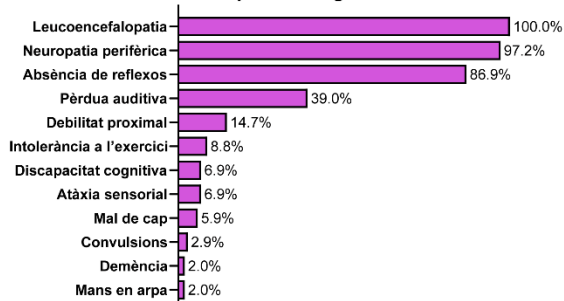
### Primer símptoma o signe



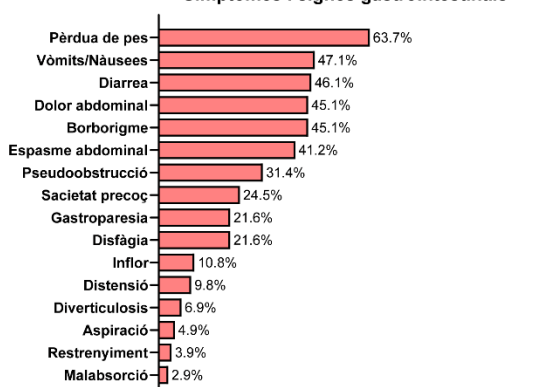
#### Síntomes i signes oculars



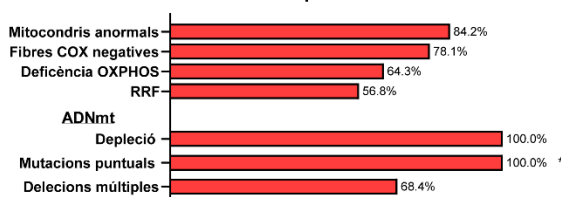
#### Síntomes i signes neuromusculars



#### Síntomes i signes gastrointestinals



#### Biòpsia muscular



**Figura 2.1. Síntomes i signes associats al MNGIE.** Gràfics elaborats a partir de les dades de [11] en una cohort de 102 pacients de MNGIE. COX: citocrom C oxidasa, OXPHOS: sistema de la fosforilació oxidativa, RRF: fibres vermelles-esquinçades.

Els primers símptomes solen aparèixer entre la segona i tercera dècada de vida (mitjana 18 anys) [11] tot i que s'han descrit casos de malalts que no debuten fins a una edat més avançada, coneguts com a “*late-onset*” MNGIE [15–17]. El MNGIE és una malaltia crònica, i els pacients empitjoren progressivament des del debut de la malaltia fins que finalment moren normalment degut a complicacions gastrointestinals. Les causes més freqüents de mort són les infeccions provocades per perforacions intestinals o pneumònia per aspiració. L'esperança de vida dels pacients és de 37 anys [11,14].

Adicionalment, degut al desconeixement de la malaltia, molts dels casos poden ser mal diagnosticats. Hi ha pacients inicialment diagnosticats amb anorèxia nerviosa, inflamació intestinal, síndrome de l'artèria superior mesentèrica, malaltia de Whipple, pseudo-obstrucció intestinal crònica, polineuropatia crònica inflamatòria desmielinizant (CIDP) o malaltia de Charcot-Marie-Tooth, entre d'altres [13,18–23]. Tot i que s'estima que la prevalença a Europa és de 1 cas per cada 1.000.000 habitants [24], actualment coneixem 5 casos a Espanya, el que sembla indicar que la prevalença real es situa al voltant de 1 cas per cada 10.000.000 habitants (aquestes dades concorden amb el que han observat col·laboradors nostres internacionals).

### 2.1.2. MNGIE COM A MALALTIA MITOCONDRIAL

En els primers pacients de MNGIE descrits, ja es van trobar evidències de disfunció mitocondrial. Per exemple, en múscul esquelètic, s'han observat deficiències en la fosforilació oxidativa (presència de fibres vermelles-esquinçades), disminució de l'activitat d'un o més complexos de la cadena respiratòria, mitocondris amb l'estructura anormal, i depleció i delecions múltiples de l'ADNmt (**Figura 2.1**) [7–11]. En estudis del tracte digestiu també s'han observat evidències de disfunció mitocondrial tant en la capa muscular com en el sistema nerviós entèric [9]. A més, estudis de diversos teixits han demostrat presència de mutacions puntuals amb diferent grau d'heteroplàsmia [25,26], així com de depleció [26,27] i delecions múltiples de l'ADNmt [28,29]. Totes aquestes alteracions de l'ADNmt són somàtiques, és a dir, no han estat heretades de la mare sinó que han estat generades durant la vida del pacient.

Els mitocondris s'encarreguen principalment de la producció d'energia mitjançant la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa, tot i que participen en molts altres processos metabòlics. Els mitocondris contenen el seu propi genoma i la seva pròpia maquinària de replicació, transcripció i traducció. Una de les característiques més importants de la genètica mitocondrial, és la presència de múltiples còpies del seu genoma a dins d'una mateixa cèl·lula, cosa que pot generar una heteroplàsmia (coexistència de seqüències genòmiques diferents en una mateixa cèl·lula). Tot i així, el genoma mitocondrial només codifica 13 proteïnes estructurals i els ARNs de transferència (ARNt) i ARNs ribosomals (ARNr). La resta de proteïnes necessàries pel seu funcionament són codificades al genoma nuclear i s'importen posteriorment al mitocondri. La genètica dual del mitocondri provoca que les patologies mitocondrials puguin tenir origen en qualsevol dels dos genomes i per tant, qualsevol tipus d'herència. Les conseqüències patològiques de les mutacions de gens de l'ADN nuclear (ADNn) que afecten al mitocondri són variables i poden afectar directament la cadena de transport electrònic, provocar defectes en el manteniment de l'ADNmt, en la traducció mitocondrial, entre d'altres [30–33].

Si ens fixem concretament en el grup de gens que afecten al manteniment de l'ADNmt, es poden diferenciar gens implicats directament en la replicació de l'ADNmt (*POLG*, *POLG2* entre d'altres); gens implicats en el manteniment de la homeòstasi del *pool* de desoxiribonucleòtids (dNTPs) mitocondrials (*TYMP*, *TK2* entre d'altres); gens implicats en la dinàmica i fusió mitocondrial (*OPA1*, *MFN2* entre d'altres) i finalment gens amb mecanismes patològics desconeguts per que també afecten el manteniment de l'ADNmt (*SUCLG1*, *SUCLA2* entre d'altres) [34,35]. Tots aquests gens provoquen una síntesi incorrecta de l'ADNmt i poden causar tant defectes quantitius en el número de còpies de l'ADNmt (depleció de l'ADNmt), com qualitius, provocant mutacions puntuals o deleccions múltiples. Col·lectivament, aquestes malalties es coneixen amb el nom síndromes de depleció i deleccions de l'ADNmt [35].

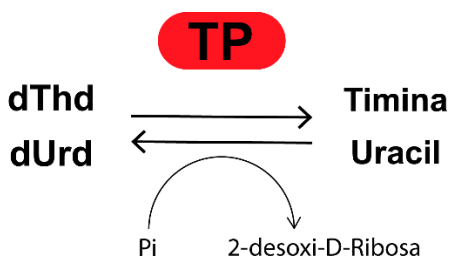
El MNGIE és la primera malaltia mitocondrial que es va associar a alteracions en el metabolisme dels substrats de la replicació de l'ADNmt, els dNTPs. A l'any 1998, Hirano i col·laboradors van determinar una regió del cromosoma 22 (22q13.32-qter)

que cosegregava en pacients de MNGIE de 4 famílies diferents [8] i un any després van identificar mutacions en el gen *TYMP* com a responsable de la malaltia [1].

### 2.1.3. CAUSA GENÈTICA DEL MNGIE

El gen *TYMP*, anteriorment conegut com *ECGF1*, consta de 4.334 parells de base (pb) i està situat al braç llarg del cromosoma 22 (GenelD 1890). Està format per 10 exons, dels quals el primer no és codificant. L'expressió de *TYMP* dona lloc a l'enzim timidina fosforilasa (TP) (EC 2.4.2.4.) també conegut amb el nom de factor de creixement cel·lular endotelial derivat de plaquetes i gliostatina.

Estructuralment, la TP és un homodímer format per dues subunitats de 50 kDa [36], formades a partir del mateix pèptid precursor de 482 aminoàcids (aa). En humans, la TP s'expressa a un nivell alt en plaquetes, limfòcits perifèrics, fetge, pulmons, tracte digestiu, pàncrees, nòduls limfàtics, melsa i no es detecta en òrgans com el ronyó, múscul esquelètic o teixit adipós [37–40].



**Figura 2.2.** Reacció catalitzada per la timidina fosforilasa (TP). Pi: Fosfat inorgànic.

La TP catalitza el primer pas del catabolisme dels nucleòsids timidina (dThd) i desoxiuridina (dUrd), que consisteix en la fosforòlisi reversible de la dThd i la dUrd donant lloc a les bases nitrogenades corresponents, timina i uracil, i a la 2-desoxi-D-ribose-1-fosfat (**Figura 2.2**). Addicionalment, s'ha descrit que la TP és un factor de creixement que promou l'angiogènesi, degut a que la 2-desoxi-D-ribose-1-fosfat actua com a agent quimioattractant per a les cèl·lules endotelials [41]. No obstant, no s'ha observat que l'angiogènesi estigui afectada en pacients de MNGIE. A més, quan es va conèixer que el que inicialment es va pensar que era un factor de creixement (*ECGF1*) era en realitat un enzim que catabolitza la timidina, va resultar evident que l'assignació d'un rol com a factor de creixement havia estat un artefacte

experimental, ja que els estudis que ho avalaven es basaven en la incorporació de timidina tritiada, que és de fet el substrat de l'enzim [41,42].

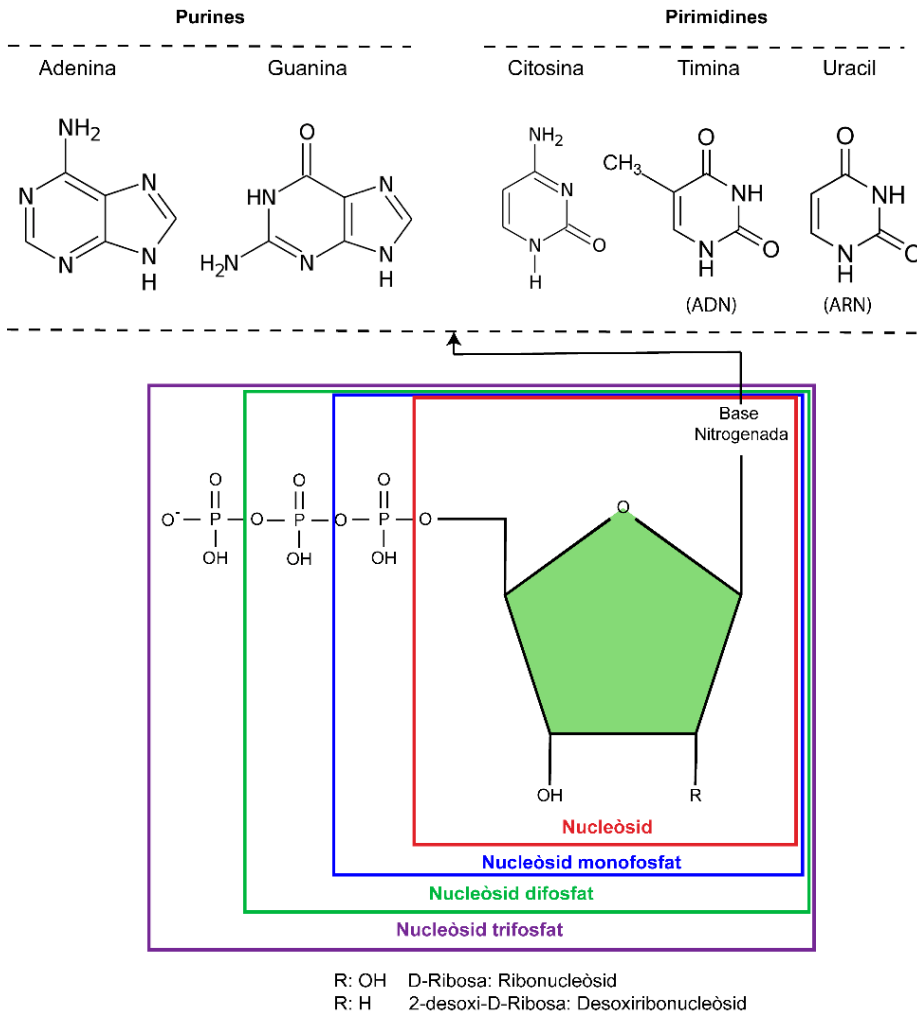
Actualment hi ha descrites 98 mutacions patogèniques de *TYMP* associades a aquesta malaltia. Degut a l'herència recessiva del MNGIE, aquestes mutacions es presenten sempre en homozigosi o en heterozigosi composta. Entre les mutacions, en trobem 59 que provoquen un canvi d'aminoàcid o l'aparició d'un codó stop prematur, 14 mutacions que fan desaparèixer una senyal de *splicing*, 13 delecions petites, 7 insercions petites, 3 *indels*, 1 deleció grossa i 1 inserció grossa (segons dades de *Human Gene Mutation Database* (HGMD® Professional 2020.1) consultada el 01/04/2020).

Les diverses mutacions no s'han associat a un fenotip concret, excepte en els casos *late-onset*, on mutacions que no condueixen a una pèrdua total de l'activitat enzimàtica estan associades a una aparició més tardana dels símptomes [15,16]. I inclús, s'han descrit casos de fenotip variable inclús entre germans amb la mateixa mutació [43]. En alguns casos, s'han observat pacients "*MNGIE-like*" amb un fenotip molt similar al del MNGIE, tot i que generalment no presenta leucoencefalopatia. Aquestes síndromes s'han associat a mutacions en altres gens com *POLG* o *RRM2B* [44–46].

#### 2.1.4. METABOLISME DE NUCLEÒTIDS

La TP és un enzim que intervé en el metabolisme dels nucleòtids. Els nucleòtids, entre altres funcions, són els monòmers que conformen els àcids nucleics ADN i ARN i es poden dividir en tres parts (**Figura 2.3**):

- Una base nitrogenada que pot ser una purina (adenina (A) i guanina (G)) o una pirimidina (citosina (C), timina (T) i uracil (U)).
- Una pentosa. Les diferents bases unides a la pentosa formen el nucleòsids i poden ser ribonucleòsids, si la pentosa es una D-ribosa, o desoxiribonucleòsids, si la pentosa es 2-desoxi-D-ribosa.
- D'un a tres grups fosfats, que formaran els nucleòsids mono-, di- i trifostats.



**Figura 2.3. Representació de l'estructura d'un nucleòtid.**

Hi ha dues rutes metabòliques que condueixen a la formació de nucleòtids: la ruta de síntesi *de novo* i la ruta de salvament [47].

La **via de síntesi *de novo*** parteix d'aminoàcids, ribosa-5-fosfat, CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub>. La síntesi de nucleòtids per aquesta via és energèticament molt cara i està activa principalment durant la fase S del cicle cel·lular, on hi ha un gran requeriment de dNTPS per permetre sobretot la replicació de l'ADN [48–50].

El producte final de la via de síntesi *de novo* és un nucleòsid monofosfat (NMP). En primer lloc, les diferents nucleòsid monofosfat quinases fosforilen els NMPs a



difosfats (NDP), i a continuació es poden fosforilar a nucleòsid trifosfat (NTP) gràcies a l'acció de la nucleòsid difosfat quinasa [47].

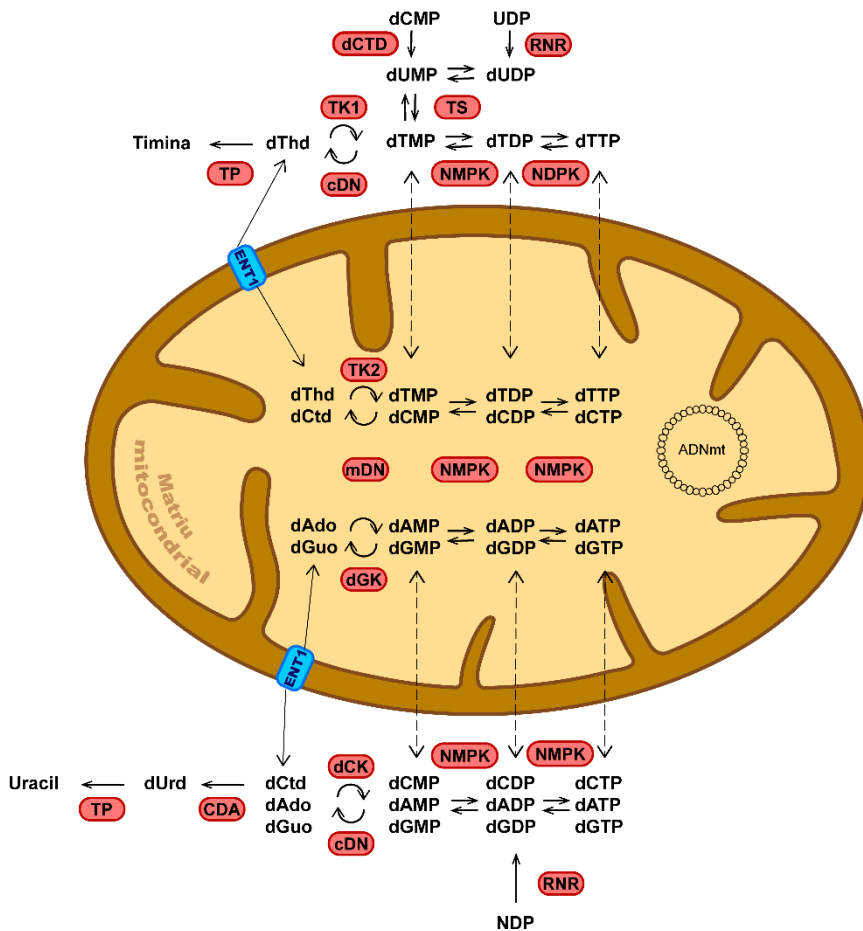
Els desoxiribonucleòtids provenen dels ribonucleòtids per reducció de l'àtom de carboni 2' de la D-ribosa per formar la 2-desoxi-D-ribosa. Aquesta reacció és el pas limitant de la via i està catalitzada per la ribonucleòtid reductasa (RNR) que actua sobre els NDPs reduint-los a desoxiribonucleòsids difosfat (dNDPs). Els dNTPs actuen com a elements reguladors de la RNR unint-se al lloc regulador i variant l'especificitat per substrat de la RNR [50,51]. L'activitat de la RNR i en conseqüència de la via de síntesi *de novo* queda restringida a la fase S del cicle cel·lular [48,50,52].

La **via de de salvament** recicla les bases lliures o nucleòsids alliberats durant la degradació dels àcids nucleics o provinents de la dieta. Aquests nucleòsids donaran lloc a nous nucleòtids gràcies a quinases específiques presents en el citosol (timidina quinasa 1 (TK1) i desoxicitidina quinasa (dCK)) o bé en el mitocondri (timidina quinasa 2 (TK2) i desoxiguanosina quinasa (dGK)) [53]. A diferència de la via de síntesi *de novo*, la via de salvament és independent del cicle cel·lular.

Els nucleòsids no reciclats es degraden per la via catabòlica. En el cas de les pirimidines la TP degrada els desoxinucleòsids, produint 2-desoxi-D-ribosa-1-fosfat i les bases nitrogenades corresponents (timina i uracil), i després d'una sèrie de reaccions catabòliques acaben generant amoníac, CO<sub>2</sub> i β-aminoisobutirat o β-alanina. Pel que fa a les purines, el producte final de degradació en humans és l'àcid úric [47].

El subministrament de dNTPs per a la replicació de l'ADNmt pot dependre o bé de la via de salvament mitocondrial, o bé de la incorporació de precursors des del citosol mitjançant diversos mecanismes (transportadors específics, o per difusió), en forma de desoxiribonucleòsids, dNMPs, dNDPs o dNTPs [48] (**Figura 2.4**).

Les dues vies estan interconnectades i la contribució de cadascuna dependrà sobretot del moment del cicle cel·lular. Fora de la fase S, la síntesi de dNTPs per la via *de novo* està molt reduïda i depèn bàsicament de la via de salvament. De manera que aquesta via és essencial per la replicació i manteniment de l'ADNmt en teixits quiescents on les cèl·lules no es divideixen [52].



**Figura 2.4. Esquema del metabolisme de nucleòtids per a la síntesi d'ADNmt.** Els enzims es representen en vermell. Abreujacions: CDA: citidina desaminasa; cdN: desoxiribonucleotidasa citosòlica; dAdo: desoxiadenosina; dCtd; desoxicitidina; dCTD: desoxicitidina monofosfat desaminasa; dCK: desoxicitidina quinasa; ENT1: transportador equilibratiu de nucleòsids 1; dGuo: desoxiguanosina; dGK: desoxiguanosina quinasa; dUrđ: desoxiuridina; mdN: deoxiribonucleotidasa mitocondrial; NDPK; nucleòsid difosfat quinasa; NMPK: nucleòsid monofosfat quinasa; RNR: ribonucleòtid reductasa; dThd: timidina; TK1: timidina quinasa1; TK2: timidina quinasa 2; TP: timidina fosforilasa; TS: timidilat sintasa.

### 2.1.5. ALTERACIONS DEL METABOLISME DE NUCLEÒTIDS EN EL MNGIE

Els pacients de MNGIE presenten valors d'activitat TP en capa leucoplaquetar inferiors al 2% dels controls sans [54]. Aquesta deficiència enzimàtica provoca un increment a nivell sistèmic de la concentració de dThd i dUrđ que arriben a valors

compresos entre 3-18  $\mu\text{M}$  de dThd i 5-25  $\mu\text{M}$  de dUrd en plasma [54]. En canvi, la concentració d'aquests nucleòsids en plasma d'individus sans i de portadors de mutacions de MNGIE (activitat TP al voltant del 35% dels controls sans) és inferior a 0,05  $\mu\text{M}$ . En els pacients de MNGIE *late-onset* s'han reportat activitats TP al voltant del 15% dels controls sans, i concentracions de nucleòsids en plasma al voltant de 1-2  $\mu\text{M}$  [15,16]. Aquest fet ha permès desenvolupar un mètode de diagnosi ràpid que es basa en la determinació de l'activitat TP de la capa leucoplaquetar de la sang i de les concentracions plasmàtiques de dThd i dUrd. Actualment, el diagnòstic bioquímic de MNGIE consisteix en concentracions elevades de nucleòsids en plasma (dThd > 3  $\mu\text{M}$  i dUrd > 5  $\mu\text{M}$ ) i activitat TP inferior al 8% de l'activitat TP de controls sans [14,54].

En pacients de MNGIE, l'acumulació de dThd i dUrd, a part d'en plasma, també s'ha observat en orina i diferents teixits [55–57]. Els nucleòsids són molècules petites i hidrosolubles que travessen les membranes cel·lulars gràcies als transportadors que es troben distribuïts àmpliament en tots els tipus cel·lulars [58] i per tant es distribueixen a nivell sistèmic en tot el volum aquós de l'organisme [59].

En teixits quiescents, aquesta acumulació de dThd i dUrd genera un desequilibri en els *pools* de dNTPs mitocondrials. L'excés de dThd inhibeix la fosforilació de la desoxicitidina (dCtd) per part de TK2, la qual cosa provoca una expansió del *pool* de dTTP i una disminució del *pool* de dCTP. Aquest desequilibri dels nivells de dNTPs mitocondrials interfereix en la correcta replicació i manteniment de l'ADNmt provocant diverses alteracions en l'ADNmt [60–63]:

- Mutacions puntuals: En pacients de MNGIE s'han descrit moltes mutacions puntuals que consisteixen sobretot en transicions de T a C en posicions precedides de seqüències poli-A (p.ex. 5'-AAT; 5'-AAAT; etc). Un dels mecanismes descrits pel qual un increment de dTTP es pot traduir en la generació d'una mutació puntual és el "*next nucleotide effect*" [25].
- Delecions múltiples: Certs gens tendeixen a ser *hotspots* per delecions múltiples, com per exemple el gen *ND5* [64]. Els mecanismes de generació de delecions múltiples en l'ADNmt que s'han proposat estan en relació a la

seva replicació, i es basen en l'aparellament incorrecte de seqüències repetides [65].

- Depleció de l'ADNmt: La depleció de l'ADNmt consisteix en una disminució del seu número de còpies i podria ser una conseqüència de la disminució dels nivells de dCTP [63]. També s'han descrit mecanismes alternatius que podrien explicar la depleció de l'ADNmt com a conseqüència de les mutacions puntuals o delecions [64].

L'acumulació dels diferents tipus d'alteracions en l'ADNmt acaba provocant una disfunció mitocondrial degut a defectes a la cadena respiratòria que afectaria principalment a aquells teixits on hi ha una demanda energètica més alta. També s'ha vist que el tipus d'alteracions predominant en l'ADNmt depèn de cada teixit. Per exemple, està descrit que el múscul té més tendència a acumular delecions múltiples [28,29], mentre que sembla que la dismotilitat gastrointestinal podria estar causada per la depleció de l'ADNmt més pronunciada en aquest teixit [25–27,64,65].

## 2.1.6. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES

Com s'ha descrit anteriorment, l'exposició continuada a l'excés tòxic dels metabòlits dThd i dUrd provoca canvis progressius i acumulatius en l'ADNmt i quan aquestes alteracions arriben a un llindar patogènic és quan es manifesta el fenotip clínic. Per aquesta raó, totes les estratègies terapèutiques proposades pel MNGIE, estan dirigides a reduir la concentració sistèmica de dThd i dUrd fins a concentracions no patogèniques, ja sigui eliminant directament els nucleòsids, o intentant proveir l'enzim de manera transitòria o permanent.

Tot i així, cal remarcar que la disfunció mitocondrial és conseqüència de l'acumulació de mutacions en l'ADNmt i de la seva depleció en el seu número de còpies. Per tant, un cop aconseguida la correcta homeòstasi dels nucleòsids s'espera una aturada en la progressió de la malaltia i posteriorment una millora clínica lenta a mesura que es van recuperant molècules funcionals d'ADNmt. De fet, s'ha observat que hi ha símptomes que no es recuperen o són de recuperació molt més lenta, sobretot els gastrointestinals [66]. És per aquesta raó que el tractament dels pacients en estadis inicials de la malaltia pot prevenir l'acumulació de danys i, per tant, es preveu que s'associï a un millor pronòstic.

Actualment no s'ha portat a terme cap assaig clínic per investigar l'efectivitat dels tractaments proposats per al MNGIE, tot i que s'han assajat algunes aproximacions terapèutiques en pacients de manera compassiva o, en tot cas, fora de protocols de recerca clínica.

Les primeres aproximacions terapèutiques van estar basades en l'eliminació directa dels nucleòsids. En primer lloc es va proposar l'hemodiàlisi, amb la qual es va aconseguir una reducció del 50% en els nivells de dThd i dUrd. Tot i que es tractava d'una reducció important, no arribava als nivells en plasma de persones sanes, l'efecte era transitori i es recuperaven els nivells inicials poques hores després del tractament [57,67,68]. Una segona estratègia va ser un procediment de diàlisi peritoneal continua ambulatoria (CAPD de l'anglès *Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis*). S'ha aplicat a 4 pacients durant varis mesos on es va reportar una millora clínica [69–72] tot i que els nivells de nucleòsids, pràcticament no disminuïen [69,70]. Actualment, només està indicada com a teràpia provisional prèvia a un tractament permanent [14,70].

Com que les teràpies d'eliminació només aconseguien una reducció transitòria dels nivells de dThd i dUrd, es va avançar cap a teràpies de substitució de la TP, i el primer estudi on es va demostrar la viabilitat d'aquest tipus de teràpia va ser la infusió de plaquetes, que són riques en activitat TP [37,73]. La infusió de plaquetes de donants sans a 2 pacients de MNGIE va proveir-los d'activitat TP en sang i va resultar en una reducció entre el 50% i 70% dels nivells de nucleòsids circulants [74] però degut a baixa vida mitja de les plaquetes [75] aquest efecte també va ser transitori. Aquesta prova de concepte va demostrar la viabilitat del tractament mitjançant la correcció en les cèl·lules sanguínies (els limfòcits i les plaquetes són rics en activitat TP [37,38]) podria aconseguir una reducció permanent dels nivells de dThd i dUrd en tots els teixits i va motivar el transplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques (AHSCT de l'anglès *Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*) com a estratègia terapèutica.

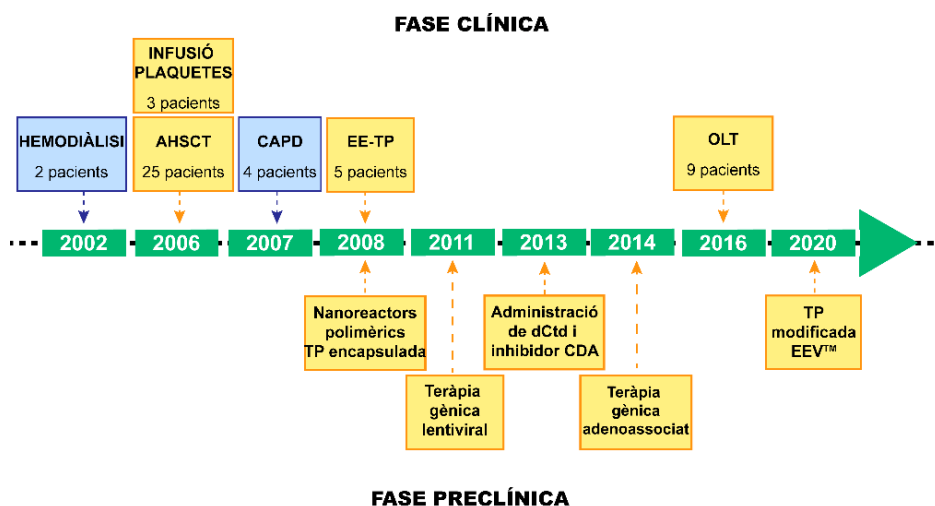
A l'any 2006, Hirano i col·laboradors van reportar, per primer cop, el AHSCT en 2 pacients de MNGIE [76]. En un dels dos pacients (aquell on es va produir correctament l'empelt), es va restaurar l'activitat TP en la capa leucoplaquetar i es van reduir els nucleòsids a valors normals d'individus sans [76]. Amb aquest cas de

tractament exitós, es van seguir tractant pacients amb AHSCT i des del cas inicial s'han trasplantat com a mínim 25 pacients de MNGIE [77,78]. En tots els pacients on hi ha hagut un empelt exitós, es va normalitzar ràpidament la funció enzimàtica TP en sang i es van reduir els nivells de nucleòsids, i a més, en la majoria dels pacients que van sobreviure més de 2 anys, es va reportar una millora clínica [77]. Tot i tractar-se d'una estratègia efectiva contra el MNGIE, l'AHSCT està associat a una elevada taxa de mortalitat degut al risc de rebuig de l'empelt, la toxicitat derivada dels medicaments utilitzats per evitar-lo, la malaltia de l'empelt contra l'hoste, així com també la limitació de trobar un donant compatible. En el cas dels pacients de MNGIE, aquest risc es veu agreujat pel fet que normalment els pacients estan en una condició clínica pobre i per tant, amb una capacitat limitada de tolerar complicacions relacionades amb els transplament. Per aquestes raons, i degut a l'alta taxa de mortalitat, l'AHSCT només s'hauria de considerar en casos de compatibilitat absoluta i en condicions òptimes del pacient [13,14,79].

A l'any 2008, es va proposar una aproximació que consisteix en l'encapsulació de TP en eritròcits (EE-TP, de l'anglès *Erythrocyte Entrapped TP*) [80], un estratègia que ja s'havia utilitzat en altres patologies (per exemple la deficiència de l'adenosina deaminasa [81]). La utilització d'eritròcits propis del pacient i encapsulació de la TP recombinant dins permet augmentar la vida mitja de l'enzim i prevenir la formació d'anticossos neutralitzants, mantenint la capacitat de l'enzim de metabolitzar la dThd i la dUrd [82]. Fins ara, s'han reportat 5 pacients tractats amb infusions mensuals d'EE-TP on s'ha aconseguit una reducció parcial en els nivells de nucleòsids en tots els casos, una certa millora clínica en 3 de 5 pacients [80,82–84] i ha estat ben tolerada i amb pocs efectes secundaris i lleus. Aquest tractament podria suposar una bona opció per a un tractament de manteniment mentre s'espera un transplament tot i que es tracti d'una teràpia cara (ja que es requereixen transfusions mensuals). Actualment, hi ha un assaig clínic de fase 2 per a determinar la seguretat, tolerabilitat, farmacodinàmica i eficàcia de dosis múltiples d'EE-TP [85] (Identificador ClinicalTrials.gov: NCT03866954).

A l'any 2016, es va proposar el transplament de fetge (OLT de l'anglès *Orthotopic Liver Transplantation*) [86]. Anteriorment, s'havia descrit que el fetge és una font important de TP i funciona de manera natural com a òrgan que destoxica molts

metabòlits [87]. Aquesta alternativa resulta més segura que l’AHSCT ja que presenta una taxa de mortalitat inferior (la taxa de supervivència a 1 any després d’un trasplantament de fetge està al voltant del 90% [88]), i no requereix d’un condicionament previ. Fins ara s’ha trasplantat el fetge com a mínim 9 pacients (7 publicats i 2 trasplantats l’any 2019 al nostre centre) i en tots els casos es reporten reduccions dels nivells de nucleòsids a concentracions inferiors a 1 µM, i a més es reporten millores clíniques a nivell neurològic i gastrointestinal [66,86,89–91]. No obstant, l’OLT presenta les limitacions intrínseques d’un trasplantament: limitacions a l’hora de trobar un donant compatible i una taxa de mortalitat associada. Addicionalment, aquesta teràpia està contraindicada en pacients amb una malnutrició severa o amb episodis previs de perforacions intestinals [14].



**Figura 2.5. Cronologia de les diferents estratègies terapèutiques proposades pel MNGIE.** En blau es troben les teràpies d’eliminació directa dels nucleòsids i en taronja les teràpies de substitució enzimàtica. AHSCT: trasplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques; CAPD: diàlisi peritoneal continua ambulatoria; CDA: citidina desaminasa; EE-TP: TP encapsulada en eritròcits; OLT: trasplantament de fetge.

Al llarg dels anys d’estudi de la malaltia, s’han proposat altres alternatives terapèutiques potencials que encara no han estat testades en pacients, i algunes de les quals es troben en fase preclínica d’investigació en models animals. Concretament s’ha proposat inhibir de la reabsorció renal de dThd i dUrd per a incrementar l’excreció d’aquests metabòlits [57]. També s’ha proposat l’administració de dCtd i/o tetrahidrouridina (un inhibidor de la citidina deaminasa) per incrementar

els nivells de dCTP mitocondrials i prevenir la disminució del número de còpies d'ADNmt [92], o l'ús de nanopartícules on es troba la TP encapsulada [93,94]. Recentment, s'ha anunciat una nova teràpia de substitució enzimàtica intracel·lular que consisteix en TP recombinant modificada utilitzant un vehicle d'escapament endosomal (EEV™) propietat d'*Entrada Therapeutics*, que ha obtingut una *Orphan Drug Designation* de la FDA [95]. Finalment, en el nostre grup hem proposat diferents estratègies de teràpia gènica de les quals es parlarà més endavant [96–100].

### 2.1.7. MODELS ANIMALS DEL MNGIE

Els models animals són fonamentals tant per a la investigació i comprensió dels mecanismes fisiopatològics de les malalties, com per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques. En el cas de MNGIE, inicialment es van generar dos models *knock-out* (KO) pel gen *Tymp* per part de dos grups independents, però cap dels dos ratolins presentava cap característica del fenotip clínic de MNGIE [60,101].

En la majoria de mamífers hi ha dos tipus de fosforilases dels nucleòsids de pirimidina, la TP i la uridina fosforilasa (UP) (que en realitat presenta dos isoenzims diferents codificats per *Upp1* i *Upp2*), i tot i que la UP humana no és capaç de catabolitzar desoxiribonucleòsids, la UP de ratolí sí [102].

Per tant, en ratolins, el catabolisme de la dThd per part de la UP podria estar impedit l'aparició d'un fenotip. Per aquesta raó es va generar el model de ratolí doble *knock-out* (dKO) *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>*. Concretament es van generar dos dKO diferents, un desenvolupat per Haraguchi i col·laboradors [101] i l'altre per López i col·laboradors [60]. La diferència entre ells és el punt on està interromput el gen *Tymp* per fer-lo *knock-out*, en el primer cas es va substituir una regió genòmica que conté 4 exons per un cassat de neomicina de 1,6kb [101], mentre que en el segon es va inserir la seqüència LoxP de 34 pb en l'exó 4 que trenca el marc de lectura i genera un codó stop prematur 12 aminoàcids després [60]. Pel que fa al gen *Upp1*, mentre que en el ratolí de Haraguchi i col·laboradors la modificació no està descrita [101] en el ratolí de López i col·laboradors es va inserir un cassat de neomicina que substituïa l'exó 4, l'intró 4 i part de l'exó 5 del gen [103]. En els dos casos els ratolins no presentaven activitat TP detectable, excepte el ratolí de López i col·laboradors que sí que presenta



una activitat residual del 17% (probablement degut a la UP2), i acumulaven nivells de dThd i dUrd d'entre 4 i 65 vegades els nivells de *wild-type* (WT).

Adicionalment, en el model de López i col·laboradors, es va observar un desequilibri en el contingut de dNTPS, generant un augment del *pool* de dTTP i una depleció del dCTP a nivell cerebral, i consegüentment una depleció en els nivells d'ADNmt en ratolins entre 14 i 18 mesos d'edat i una disminució de l'activitat dels complexos I i IV. També es va observar, en imatges obtingudes per ressonància magnètica nuclear (MRI) de cervell l'existència de leucoencefalopatia en la substància blanca [101].

Els dos models dKO no reproduïen gairebé cap dels trets clínics característics de la malaltia, cosa que es podria deure a diverses raons. En primer lloc el metabolisme de nucleòsids en humans i ratolins és diferent, mentre que en humans, els controls sans presenten valors de dThd i dUrd inferiors a 0,05  $\mu\text{M}$  en plasma, els ratolins WT tenen valors al voltant de 2-3  $\mu\text{M}$  [98]. Per tant, en termes relatius, l'augment en la concentració de nucleòsids que es produeix en ratolins dKO és molt inferior al augment observat en pacients de MNGIE. En segon lloc, el fenotip clínic en els pacients sol aparèixer en la segona dècada de vida, quan les mutacions en l'ADNmt han arribat a un llindar patològic. En aquest sentit, és possible que en ratolí, degut al seu període de vida més curt comparat amb els humans, no s'arribi a aquest llindar i per tant no desenvolupi el fenotip clínic característic dels pacients de MNGIE.

A l'any 2014, Garcia-Díaz i col·laboradors van descriure que l'administració crònica de dThd i dUrd al llarg de tota la vida del model de ratolí dKO de López i col·laboradors aconseguia accentuar el fenotip del ratolí, que en aquestes condicions reproduïa més clarament algunes característiques clíniques dels pacients de MNGIE. Van observar que els ratolins dKO sotmesos a una administració oral continuada de dThd i dUrd presentaven deteriorament de la funció neuromuscular. A nivell intestinal, van reportar una disminució de la musculatura llisa, un augment de la fibrosi i depleció de l'ADNmt en intestí prim. En la MRI es va observar que leucoencefalopatia augmentava (hi havia un increment en la hiperintensitat de la senyal de FLAIR) amb dosis més altes o més llargues de l'administració crònica. Finalment també van observar que els ratolins presentaven

una esperança de vida menor, una lleugera disminució del pes i de força muscular [104].

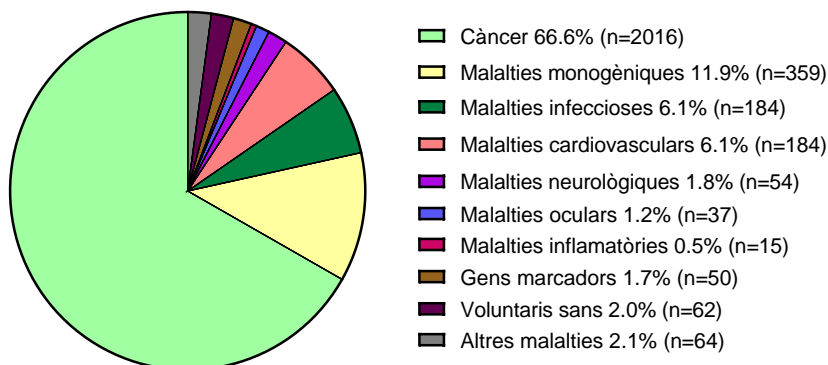
## 2.2. TERÀPIA GÈNICA

### 2.2.1. INTRODUCCIÓ A LA TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica és una tècnica experimental que busca modificar o manipular l'expressió de gens, o alterar les propietats biològiques de les cèl·lules amb objectiu terapèutic. Es pot aconseguir mitjançant diversos mecanismes: substitució o edició d'un gen existent que funciona incorrectament per la versió correcta, inactivar un gen causant d'una malaltia que no funciona correctament o introduir una nova còpia del gen causant de la malaltia [105].

Fins a l'actualitat s'han realitzat més de 3.000 assajos clínics de productes relacionats amb la teràpia gènica per a diferents indicacions, tot i que fins ara, 2 de cada 3 dels assajos clínics autoritzats estan relacionats amb el càncer (dades actualitzades a desembre de l'any 2019) (**Figura 2.6**) [106]. Pel que fa a la translació a la practica clínica, a l'agost de 2019, s'havien aprovat 22 tractaments de teràpia gènica a tot el món [107]. Entre ells, a l'any 2012, l'agència europea del medicament (EMA) va aprovar *Glybera* (un medicament basat en una aproximació de transferència genètica amb un vector adenoassociat (rAAV) que es va convertir en primer producte de teràpia gènica per a una malaltia monogènica (deficiència de la lipoproteïna lipasa) aprovat a Europa [107,108].

Els avantatges que ofereix la teràpia gènica en el tractament de malalties monogèniques consisteixen en la correcció del defecte genètic a llarg termini amb una sola administració i la possibilitat d'un tractament selectiu del teixit afectat. No obstant, també té inconvenients com la possible activació d'oncogens degut a mutagènesis insercional per part de vectors integratius o l'activació de la resposta immune en front el vector o el gen terapèutic transferit [109–111].



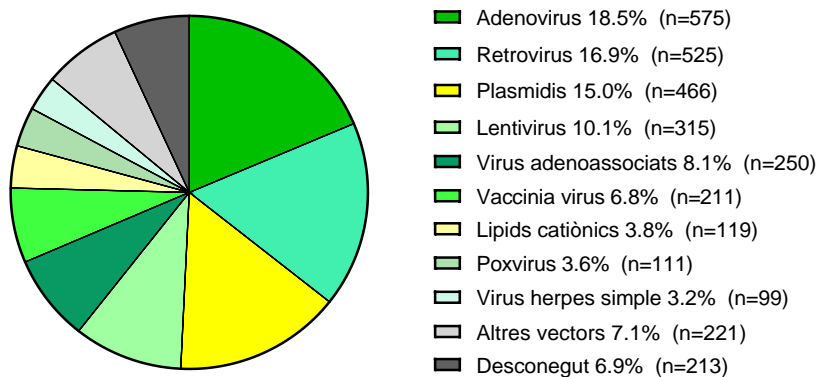
**Figura 2.6. Número d'assajos clínics segons la indicació** (actualitzat al desembre de 2019 amb dades de [106]).

Pel tractament de les malalties monogèniques degut a pèrdua de funció d'un gen, de manera general es poden dur a terme dues estratègies bàsiques: un vector integratiu que s'introdueix a una cèl·lula precursora o a una cèl·lula mare de manera que el gen terapèutic es passi a totes les cèl·lules filles d'aquell llinatge, o bé un vector no integratiu que es dirigeix a un teixit postmitòtic o que es divideix molt lentament, i en aquest cas l'ADN lliurat s'estabilitza de manera extracromosòmica. En general, la transducció d'una cèl·lula precursora és un procés *ex vivo* i requereix un vector integratiu mentre que la transducció d'un teixit postmitòtic es realitza per lliurament *in vivo* del material genètic terapèutic [111]. D'altra banda, en els últims anys s'està treballant en estratègies d'edició gènica de la còpia no funcional del gen.

### 2.2.2. SISTEMES DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA

La manipulació de l'expressió gènica es realitza mitjançant la introducció d'àcids nucleics exògens (ADN, ARNm, ARN petits d'interferència (siRNA), microARN (miRNA) o oligonucleòtids antisentit). Com que els àcids nucleics terapèutics estan carregats negativament i generalment es tracta de molècules grans, la transferència gènica normalment ha d'estar mediada per vectors. La funció principal del vector és protegir el material genètic terapèutic de ser degradat i lliurar-lo de forma íntegra a la cèl·lula diana [112,113]. L'elecció del vector és un pas crític en el procés de la teràpia gènica i dependrà en cada cas de les cèl·lules diana i les seves característiques, de la necessitat de la duració de l'expressió, i de la mida del material genètic que es vulgui transferir [114]. Hi ha dos mètodes diferenciats de transferència

gènica: la transfecció, on s'utilitzen vectors no virals, i la transducció, on s'utilitzen vectors basats en virus. Pràcticament un 70% dels assajos clínics de teràpia gènica han estat basats en vectors virals (**Figura 2.7**) [106].



**Figura 2.7. Número d'assajos clínics segons el vector utilitzat.** En diferents tonalitats de verd es representen els vectors virals i en tonalitats de groc els vectors no virals. Actualitzat al desembre de 2019 amb dades de [106].

### 2.2.2.1. Vectors no virals

Els vectors no virals s'utilitzen per transferir tant molècules d'ADN (oligonucleòtids o plasmidis), com molècules d'ARN (ARNm, siRNA, miRNA o riboenzims). S'administren utilitzant mètodes físics (injecció amb agulla al teixit o sistèmica en un vas sanguini; injecció balística; electroporació; sonoporació; fotoporació; magnetotransfecció; hidroporació; massatge mecànic en certs teixits) i poden estar nus, recoberts amb partícules inorgàniques, lípids catiónics, nanoemulsions de lípids, partícules basades en pèptids, compostos polimèrics, o dins d'altres sistemes biològics diferents de virus (bacteris, bacteriòfags, partícules virus-*like*, eritròcits fantasma o exosomes) [113–117].

L'obstacle més gran que presenten els vectors no virals és la seva baixa taxa de transferència de material genètic en comparació amb els vectors virals. Els vectors han de superar una sèrie de barreres cel·lulars que dificulten la incorporació de material genètic exogen. Aquests vectors han de superar les endonucleases del sèrum, els macròfags, han de ser capaços de realitzar un escapament endosomal per prevenir la degradació lisosomal, a més d'altres interaccions inespecífiques

[117,118]. Una altra limitació és que els vectors no virals solen proporcionar una expressió transitòria del transgèn [114].

No obstant, els vectors no virals presenten alguns avantatges respecte els vectors virals, sobretot pel que fa a la seva seguretat, ja que els pacients no presenten immunitat preexistent contra ells, i un cop administrats desenvolupen una resposta immune menor que els vectors virals. A més, no hi ha una limitació en quan a la mida del transgèn i són més fàcils i barats de produir que els vectors virals [112,114,119].

### 2.2.2.2. Vectors virals

*Taula 2.1. Principals vectors virals i les seves característiques*

Virus	Genoma	Capacitat	Característiques	Referència
Adenovirus	dsADN	Fins a 36 kb en funció del tipus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampli espectre de cèl·lules hoste</li> <li>• Expressió transitòria</li> <li>• Molt immunogen</li> </ul>	[120,121]
Adenoassociat	ssADN	4,7 kb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampli espectre d'hostes</li> <li>• No integratiu</li> <li>• Immunogen</li> </ul>	[122]
Herpesvirus	dsADN	Fins a 150 kb en funció del tipus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampli espectre de cèl·lules hoste</li> <li>• Infecció latent</li> <li>• Capacitat de clonació molt alta</li> </ul>	[123,124]
Retrovirus	ssARN	8 kb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Només cèl·lules en divisió</li> <li>• Expressió llarg termini</li> <li>• Integració aleatòria al genoma</li> </ul>	[123]
Lentivirus	ssARN	8 kb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampli espectre de cèl·lules hoste</li> <li>• Expressió llarg termini</li> <li>• Baixa citotoxicitat</li> </ul>	[125]
Poxvirus	dsADN	25 kb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampli espectre d'hostes</li> <li>• Capacitat de clonació alta</li> <li>• Expressió transitòria</li> </ul>	[123,126]

*dsADN: ADN de doble cadena; kb: kilobase; ssADN: ADN de cadena simple; ssARN: ARN de cadena simple.*

Els virus han evolucionat de manera natural per a lliurar material genètic a les cèl·lules i superar totes les barreres cel·lulars. Els vectors virals estan basats en l'ús de virus modificats de manera que no tenen la capacitat de generar noves partícules virals, però s'aprofita la seva capacitat de transduir cèl·lules humanes. Els vectors virals tenen una gran eficiència en la transferència del material genètic, però presenten problemes pel que fa a immunitat i citotoxicitat, així com certs aspectes de bioseguretat.

Els vectors virals s'utilitzen tant per estratègies d'expressió transitòria com d'expressió a llarg termini, i estan basats tant en virus d'ADN com d'ARN, de cadena simple o doble [126]. Els principals grups de vectors virals estan resumits a la **Taula 2.1**.

#### **2.2.2.2.1. Vectors basats en adenovirus**

Els adenovirus (Ad) contenen un genoma d'ADN de doble cadena d'entre 26-45 kb, i no tenen capacitat integrativa, de manera que el material genètic roman a la cèl·lula en forma episomal. Són patògens dels humans i estan associats a malalties respiratòries generalment lleus. Els adenovirus tenen capacitat per infectar tot tipus de cèl·lules, tant cèl·lules replicatives com en quiescència. Se n'han descrit més de 50 serotips diferents, alguns dels quals estan presents de manera ubíqua en persones, i per tant molts adults tenen anticossos preexistents contra els Ad [120], cosa que fa que molts dels seus serotips no es puguin utilitzar en teràpia gènica.

S'utilitzen com a vectors de teràpia gènica degut a la seva alta eficiència de transducció en tot tipus de cèl·lules, perquè permeten la modificació de la càpsida per reorientar el seu tropisme, són fàcil de produir a títols alts i poden empaquetar una quantitat alta de material genètic (els vectors Ad "*gutless*" fins a 36 kb).

Un dels principals inconvenients dels vectors Ad és que generen una alta resposta immunitària degut tant a la càpsida com al genoma viral, i tot i que s'ha intentat disminuir la immunogenicitat eliminant tots els gens virals en els vector *gutless*, aquests segueixen desencadenant una resposta immune innata degut a la càpsida del vector que pot provocar la mort en casos d'una administració d'una dosi alta de vectors [121,126].

Actualment, els vectors Ad són els més utilitzats en assajos clínics de teràpia gènica (18,5% dels assajos [106]) en diferents aplicacions com a immunoteràpia del càncer, vectors per a vacunes d'ADN i teràpia gènica per a malalties monogèniques [120].

#### **2.2.2.2. Vectors basats en herpesvirus**

Els herpesvirus (HSV) són una família de virus amb un genoma d'ADN de doble cadena i presenten una càpsida icosaèdrica i una envolta. Tot i que hi ha diversos virus en aquesta família, els vectors deriven principalment del HSV tipus I (HSV-1), el genoma del qual té una mida d'unes 150 kb i que codifica uns 90 gens [127,128].

Es tracta d'uns vectors virals interessants bàsicament degut a tres propietats. En primer lloc, els vectors basats en HSV poden arribar a tenir una capacitat d'empaquetament de fins a 150 kb, i aquest ADN no s'integra en el genoma, reduint el risc de mutagènesis insercional. En segon lloc, la deleció de gens no essencials per la replicació compromet la capacitat de replicació *in vivo* del virus, però no *in vitro*. Aquest fet ha permès per exemple crear vectors que només són replicatius en cèl·lules cancerígenes [129]. I en tercer lloc, tot i que poden transduir un ampli espectre de cèl·lules, tenen tropisme i adaptacions per transduir el sistema nerviós central (CNS de l'anglès *Central Nervous System*) de manera molt eficient i tenen la capacitat de generar infeccions latents en neurones. No obstant, encara no s'ha aconseguit que l'expressió de transgens que dirigeixen aquests vectors sigui a llarg termini. Una de les principals limitacions pel seu ús és que el HSV-1 és endèmic i hi ha uns alts nivells d'immunitat preexistent [123,124].

Actualment, un 3,2% dels assajos clínics estan basats en vectors derivats de HSV i les aplicacions on més s'utilitzen és pel tractament de càncer [106].

#### **2.2.2.3. Vectors basats en poxvirus**

Els poxvirus, també coneguts com *vaccinia* virus, són virus amb envolta que tenen un genoma d'ADN de doble cadena d'una mida d'unes 200 kb. Els vectors derivats dels poxvirus tenen una capacitat per acceptar fins a 25 kb d'ADN, cosa que els fa útils per a l'expressió de gens grans. Degut a que expressen de forma intensa i transitòria el seu transgèn, els vectors derivats de *vaccinia* virus s'ha utilitzat bàsicament per a teràpia oncolítica del càncer, immunoteràpia del càncer i per a

generar vacunes [123,126]. Per exemple s'han generat vectors que són capaços de replicar en cèl·lules tumorals sense danyar les cèl·lules normals, mitjançant la deleció dels gens virals de la timidina quinasa i del factor de creixement del *vaccinia* [130]. Aquests vectors s'han utilitzat en un 10,4% dels assajos clínics [106].

#### 2.2.2.2.4. Vectors retrovirals i lentivirals

Els retrovirus són una família de virus d'ARN de cadena senzilla amb envolta amb un diàmetre de 100 nm. El seu genoma té una mida de 8-10 kb i és diploide. Un cop a dins la cèl·lula, el seu genoma es retrotranscriu a ADN i s'integren en el genoma de la cèl·lula hoste.

Els retrovirus s'han considerat vectors ideals per a la teràpia gènica gràcies a la seva capacitat per integrar el seu genoma al cromosoma i expressar-se de manera estable encara que la cèl·lula es divideixi. Trobem dos tipus de vectors retrovirals per a la teràpia gènica. Els vectors  $\gamma$ -retrovirals estan basats en el virus de la leucèmia murina que es tracta d'un retrovirus simple, i els vectors lentivirals (LVs), basats en el virus de la immunodeficiència humana [131].

L'avantatge dels LVs respecte els vectors  $\gamma$ -retrovirals és que els lentivirals poden transduir tant cèl·lules en divisió com en quiescència. No obstant, els lentivirus són patògens humans i per tant la seva utilització genera inquietuds en qüestions de seguretat. Particularment, s'ha de considerar la possibilitat de que en el procés de generació de vectors defectius en la replicació, es generin també partícules de lentivirus replicatives.

En aquest sentit, s'han desenvolupat diverses estratègies per a incrementar la seguretat dels LVs, i les últimes millores consisteixen en vectors on s'ha eliminat tots els gens virals, on s'ha reduït la capacitat promotora del seu genoma i s'ha reduït la possibilitat de mobilització dels vectors integrats per part d'un lentivirus WT (vectors SIN de l'anglès *self-inactivating*) [132,133].

Actualment, s'ha realitzat 840 assajos clínics basats en retrovirus que representen un 26,9% dels assajos clínics que s'han realitzat en teràpia gènica (524 (17%) basats en vectors  $\gamma$ -retrovirals i 304 (9,9%) en vectors lentivirals [106]). Tot i que s'utilitzen per a tractar molts tipus de malalties, la seves aplicacions principals són la



modificació *ex vivo* de limfòcits T per expressar receptors d'antigen quimèrics (CAR-T) per a la teràpia del càncer, i la teràpia gènica en immunodeficiències primàries [125].

#### 2.2.2.2.5. Vectors adenoassociats

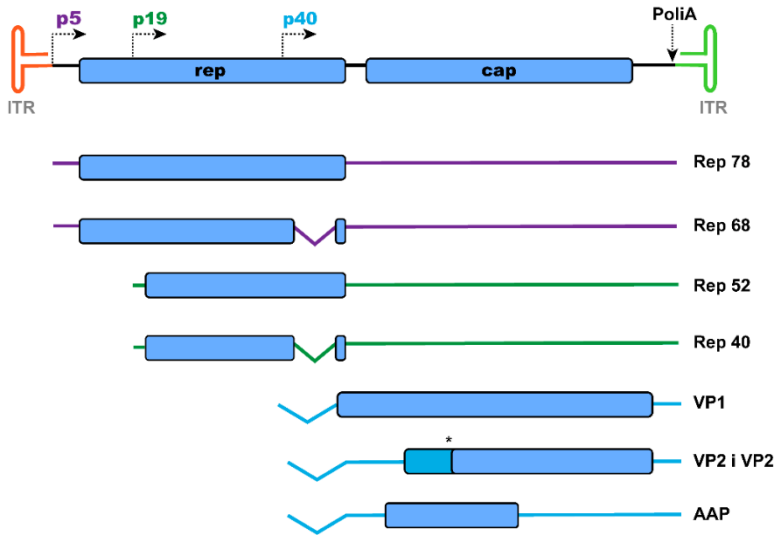
Els virus adenoassociats (AAV) pertanyen a la família *Parvoviridae*, i concretament al gènere dels *Dependovirus*. Els AAV són virus petits, sense envolta, el seu genoma és d'ADN de cadena simple lineal d'una mida aproximada de 5 kb i es van identificar per primera vegada com a contaminants de preparacions d'adenovirus. Actualment s'han aïllat 13 serotips naturals (AAV1-13) per humans i primats, i també s'han identificat AAVs en un ampli ventall d'altres espècies de vertebrats, com vaques, cavalls, ovelles i ocells. Per a la seva replicació, els AAV depenen d'un virus *helper* que pot ser un adenovirus, un herpes virus simple, un *vaccinia* virus, o un virus del papil·loma humà. Tot i que una gran part de la població humana presenta anticossos contra diferents serotips d'AAV, no s'han associat clarament a cap malaltia [134–136].

#### CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS DELS AAV

El virió dels AAV consisteix en una petita càpsida icosaèdrica de 28 nm de diàmetre, que li dona tropisme al virus. A dins de la càpsida, es troba el genoma que consisteix en una molècula d'ADN de cadena simple d'unes 4,7 kb.

La càpsida vírica dels AAV té forma icosaèdrica i consisteix en 60 unitats estructurals, cadascuna de les quals té regions variables exposades a la superfície del virió que determinen el tropisme de l'AAV i el tràfic intracel·lular del virió. Aquestes regions són típicament reconegudes pels anticossos neutralitzants. Per tant, la seva modificació pot variar tant l'eficiència de transducció com la capacitat d'unió dels anticossos neutralitzants a la càpsida vírica [137].

El genoma de l'AAV2, que va ser el primer que es va identificar i caracteritzar, té 4.769 pb. El genoma pot ser tant de cadena positiva com negativa [134] i consta de 3 elements principals: les **ITR** (de l'anglès *inverted terminal repeat*) i els gens **cap** i **rep** (**Figura 2.8**).



**Figura 2.8. Genoma dels AAV.** Esquema del genoma dels AAV i dels diferents ARNm (i les seves variants de splicing) que es transcriuen a partir de cadascun dels promotors i donen lloc a les proteïnes virals.

A cada extrem del genoma viral hi ha una **ITR**, gairebé idèntica als dos costats [138]. Es tracta d'una seqüència de 145 nucleòtids, dels quals 125 tenen una seqüència palindròmica que es plega sobre ella mateixa formant una estructura de *loop* en forma de T, que consisteix en 2 palíndroms curts flanquejat per un de llarg. En aquestes seqüències s'hi troba l'origen de replicació, la senyal d'empaquetament i també intervenen en el procés d'integració del genoma viral [139].

La regió codificant **rep** codifica 4 proteïnes requerides per diferents funcions del cicle viral: Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40. [134,139].

La regió codificant **cap** codifica les 3 proteïnes de la càpsida viral VP1, VP2 i VP3.

Finalment, el gen **aap** codifica una proteïna activadora del procés d'assemblatge del virió (AAP) i està situat en un marc de lectura diferent dins de la regió codificant de *cap* [140–142].

## CICLE VÍRIC DELS AAV

Els AAV poden infectar tant cèl·lules en divisió com cèl·lules en quiescència. No obstant, no són capaços de produir una infecció vírica productiva per si mateixos, i la seva infecció *in vivo* està limitada per la necessitat de coinfecció amb un virus

*helper* (normalment un Ad). Sense la presència d'un virus *helper*, l'AAV queda en estat de latència [122]. El seu cicle està compost de diverses etapes que es descriuen a continuació i es troben resumits a la **Figura 2.9**.

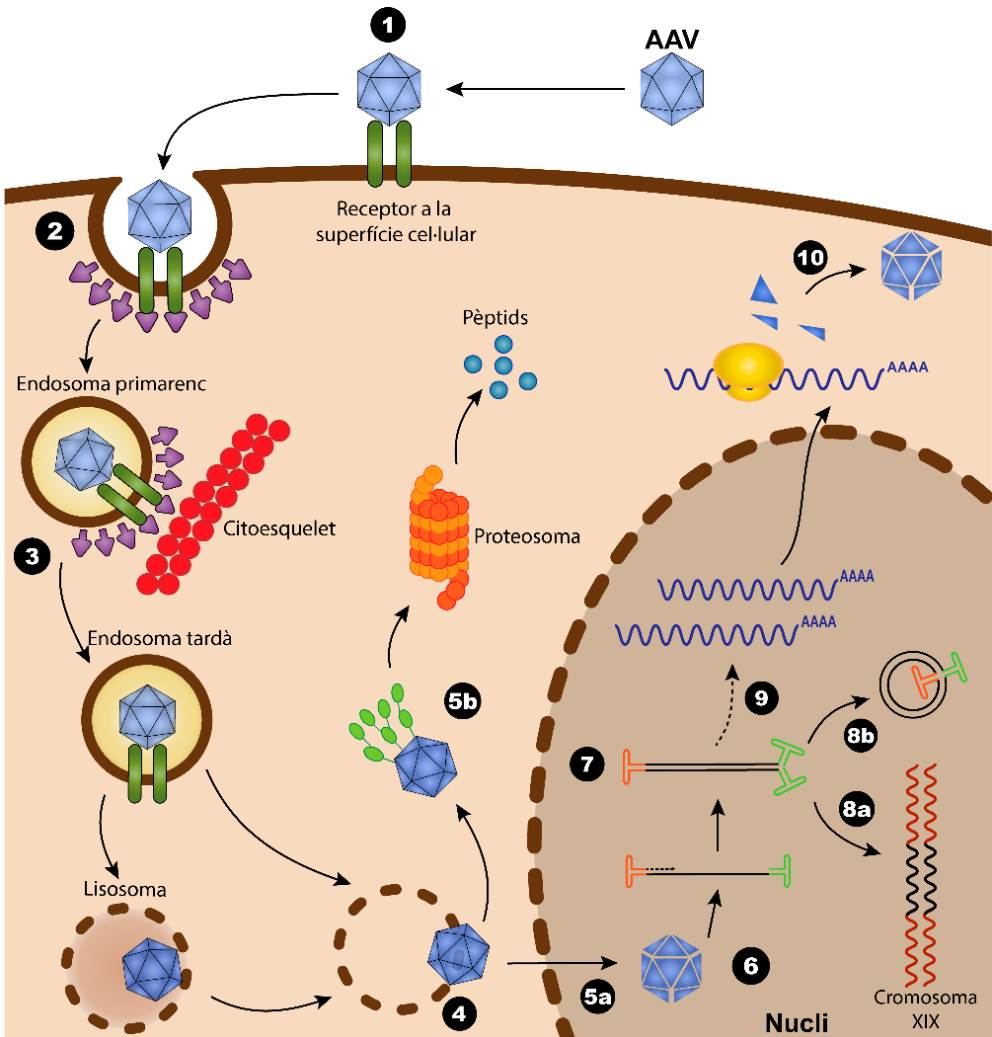
### *Unió amb el receptor*

Els AAV interaccionen amb les cèl·lules a través dels carbohidrats de glicoproteïnes presents a la superfície de les cèl·lules diana. Les diferents preferències d'unió de les proteïnes de la càpsida confereixen un tropisme cel·lular i tissular específic a cada serotip. Addicionalment, s'han identificat receptors secundaris que també tenen un paper important en la transducció viral i contribueixen al tropisme [143]. Un d'aquests receptors secundaris és l'AAVR que és requerit per la transducció en múltiples serotips (AAV1, AAV2, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV8 i AAV9). Encara no es coneix exactament el paper d'aquest receptor però, a part de la unió, també podria tenir un paper també en el transport intracel·lular dels AAV, i fins i tot en l'escapament endosomal [144–146].

### *Internalització i transport al nucli*

Una vegada l'AAV ha interaccionat amb el seu receptor de superfície, comença el procés d'endocitosi que és ràpid i eficient i no resulta limitant en el cicle d'infecció del virus [147].

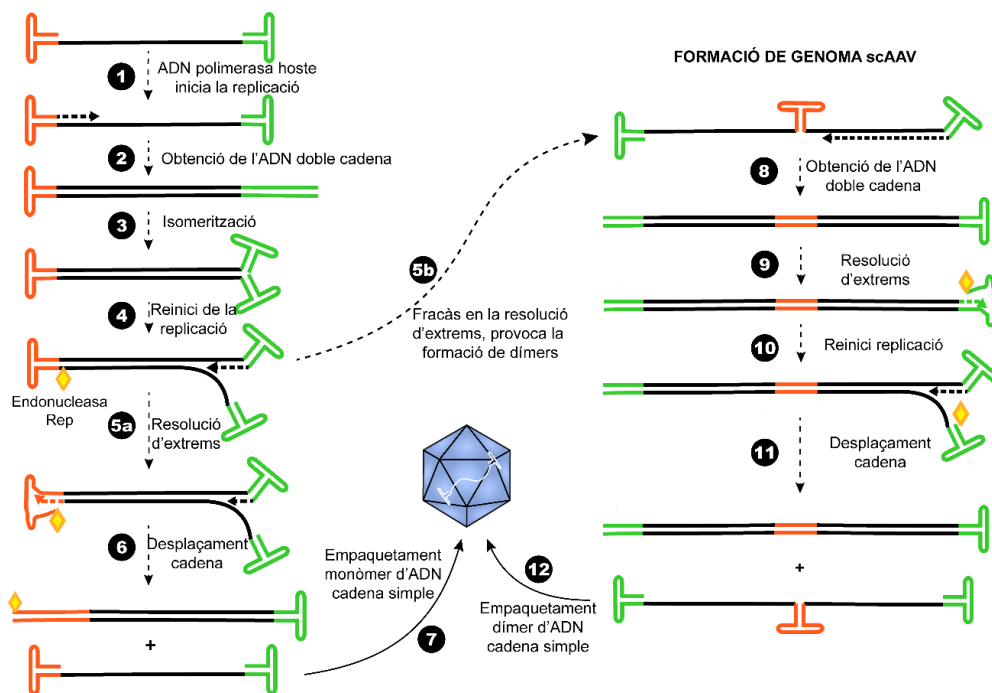
Pel contra, el procés de transport intracel·lular d'AAV és lent i ineficient. Els virions, un cop estan dins dels endosomes, es transporten pel citosol mitjançant els microtúbuls en un transport retrògrad fins al aparell de Golgi des d'on s'alliberen al citoplasma i es transporten al nucli [147]. Els virions poden ser ubiquitinats per la seva degradació al proteosoma o continuar amb el seu cicle infectiu mitjançant el desacobrament de la càpsida. Aquest pas també s'ha identificat com un dels passos limitant en la infecció, degut a que la càpsida dels AAV és molt estable [147,148].



**Figura 2.9. Transducció i cicle viral dels AAV.** Els virions s'uneixen als seus receptors i coreceptors en la superfície de la membrana de les cèl·lules hoste (pas 1), i entren a la cèl·lula via endocitosis per varis mecanismes (pas 2). Els endosomes que contenen el virió es transporten pel citosol amb l'ajuda del citoesquelet (pas 3) i s'escapen de l'endosoma (pas 4). A partir d'aquest punt, els virions poden ser ubiquitinats i degradats al proteosoma (pas 5b) o entrar al nucli (pas 5a). Un cop dins del nucli, es desacobla la càpsida i s'allibera el genoma viral (pas 6) i es procedeix a la síntesi de la doble cadena de l'ADN viral (pas 7). En aquest punt, es pot integrar al cromosoma 19 (pas 8a) mantenir-se en forma episomal (pas 8b), però ja està es pot iniciar la transcripció (pas 9) i traducció de les proteïnes virals. Finalment les proteïnes i els genomes s'acoblen per formar nous virions (pas 10) i els virions s'alliberen al medi extracel·lular lisant la cèl·lula hoste.

*Pas a ADN de doble cadena*

Per tal de que l'ADN viral que està al nucli sigui transcripcionalment actiu primer s'ha de convertir a ADN de doble cadena mitjançant l'ADN polimerasa del hoste (**Figura 2.10**), tot i que també pot donar-se l'aparellament d'una cadena positiva i una negativa de diferents virions que hagin coinfectat la mateixa cèl·lula [143].



**Figura 2.10. Síntesi de la segona cadena d'ADN en la infecció per AAV.** La replicació del genoma pot donar lloc a la formació natural d'AAV autocomplementaris (scAAV) (Pas 5b) si hi ha un fracàs en la resolució dels extrems de les ITR en un pas que implica un tall de l'endonucleasa Rep.

La síntesi de la segona cadena d'ADN comença a partir de la ITR 3' (pas 1 **Figura 2.10**). L'ADN polimerasa de la cèl·lula pot utilitzar aquest grup hidroxil 3' per iniciar la replicació, i així la mateixa molècula d'ADN serveix com a encebador i com a motlle per la replicació (pas 2 **Figura 2.10**). Un cop s'ha obtingut una molècula de doble cadena amb una ITR a un extrem, l'ARN polimerasa II ja ho pot utilitzar per transcriure els ARNm virals [149]. A continuació, el dúplex de l'ITR es plega (pas 3 **Figura 2.10**) generant un nou extrem 3' que l'ADN polimerasa pot utilitzar per reiniciar la replicació (pas 4 **Figura 2.10**) .

Per la síntesi de nous genomes virals, la Rep78/68 fa un tall en la cadena original, just en el punt on comença la ITR 3' (pas 5a **Figura 2.10**), i a partir es finalitza la còpia de la cadena i s'empaqueta la cadena desplaçada (pas 6 i 7 **Figura 2.10**) [138].

#### *Transcripció i expressió de les proteïnes virals*

L'expressió del genoma víric comença amb la presència d'un virus *helper*. En general, les funcions dels virus *helper* són incrementar la producció de proteïnes de l'AAV, i alterar l'ambient cel·lular per promoure la replicació de l'AAV i la seva alliberació al medi. [138].

En absència del virus *helper*, el genoma de l'AAV es pot quedar en estat de latència durant anys. En aquest cas, el genoma viral es pot circularitzar per recombinació homòloga a les ITRs formant monòmers, dímers i concatèmers circulars via interaccions intramoleculares o intermoleculares, o bé pot integrar-se al genoma cel·lular (en un procés depenent de la proteïna Rep) específicament a la regió q13.4, denominada AAVS1, del cromosoma 19 [150].

#### SEROTIPS I TROPISME DELS AAV

Fins ara, s'han descrit més de 100 seqüències d'AAV que infecten diferents espècies, de les quals 13 són serotips naturals (AAV1-13) per humans i primats no humans [151,152]. S'han desenvolupat varis estudis per determinar el tropisme dels diferents serotips naturals d'AAV en diferents organismes [152,153] (**Taula 2.2**), que es defineix com la preferència de transducció per un tipus cel·lular o teixit concret.

**Taula 2.2. Receptors, coreceptors i tropisme dels diversos serotips naturals d'AAV**

Serotip	Receptor	Co-receptor	Tropisme
AAV1	Àcid siàlic	AAVR	Múscul, CNS, cor, pulmó, pàncreas, ull
AAV2	HSPG	AAVR, FGFR, HGFR, Integrina, LamR	Fetge, CNS, múscul, ronyó
AAV3	HSPG	AAVR, FGFR, HGFR, LamR	Múscul i medul·la òssia
AAV4	Àcid siàlic	Desconegut	Ull, CNS
AAV5	Àcid siàlic	AAVR, PDGFR	CNS, pulmó, ull, fetge
AAV6	HSPG	AAVR, EGFR	Múscul, CNS, cor, pulmó i medul·la òssia
AAV7	Desconegut	Desconegut	Múscul, CNS, ull
AAV8	Desconegut	AAVR, LamR	Fetge, múscul, cor, pàncreas i CNS, ull
AAV9	Galactosa	AAVR, LamR	Fetge, cor, cervell, múscul, pulmó, pàncreas i ronyó
AAV10	Desconegut	Desconegut	Múscul
AAV11	Desconegut	Desconegut	Desconegut
AAV12	Desconegut	Desconegut	Desconegut
AAV13	HSPG	Desconegut	Desconegut

*Elaborada a partir de dades de [152–154]. HSPG: heparà sulfat; AAVR: receptor dels AAV; FGFR: receptor del factor de creixement de fibroblasts; HGFR: receptor del factor de creixement dels hepatòcits; LamR: receptor de la laminina; CNS: Sistema nerviós central.*

## VECTORS AAV RECOMBINANTS (rAAVS)

Els rAAV presenten molts avantatges per la seva aplicació clínica en teràpia gènica. En primer lloc, són capaços de transduir de forma latent tant cèl·lules en divisió com en quiescència. A més, el gran nombre de serotips proporciona un ampli ventall de tropismes. Finalment, tot i que s'ha vist genotoxicitat dels rAAV en alguns casos puntuals i condicions molt concretes en models de ratolí [155,156], no hi ha evidències de genotoxicitat en estudis a llarg termini en animals més grans com gossos [157] ni primats no humans [158], i tampoc s'ha observat genotoxicitat en el seguiment a llarg termini de pacients en assajos clínics [122].

A diferència dels AAVs, el genoma de doble cadena dels rAAVs utilitzats en teràpia gènica no s'integra de manera específica al genoma cel·lular, sinó que es manté majoritàriament en forma episomal al nucli de les cèl·lules transduïdes degut a l'absència de les proteïnes Rep [150,159,160].

El genoma dels rAAV estan desproveïts dels elements cap i rep i les úniques seqüències d'origen viral que queden són les ITRs, que són necessàries per guiar la replicació del genoma i l'empaquetament durant la producció dels vectors. Per tant, l'eliminació completa dels gens virals alliberen 4,7 kb que queden disponibles per a clonar el material genètic terapèutic, i que generalment consta d'un cassat d'expressió que té 3 elements principals: un promotor, la seqüència codificant del gen terapèutic i un senyal de poliadenilació [122,137].

L'elecció de la càpsida viral del rAAV dependrà del òrgan diana on es vulgui dirigir la teràpia. A la **Taula 2.2** es mostra el tropisme natural dels diferents serotips d'AAV per a diferents òrgans, però en el cas dels rAAV, a part del tropisme natural, també existeixen altres factors que poden influir en la transducció, com la via d'administració del rAAV, la dosi, l'espècie animal, el sexe, la presència d'anticossos neutralitzants o fins i tot el mètode de producció utilitzat per obtenir-los [153,161,162].

### *Teràpia gènica dirigida al fetge mitjançant rAAV*

El fetge posseeix certes característiques que el fan un òrgan molt atractiu pel que fa a la teràpia gènica basada en l'ús de rAAV. En primer lloc, tots els serotips naturals d'humans menys l'AAV4 mostren cert tropisme hepàtic [153]. En segon lloc, degut a les característiques anatòmiques del fetge, els hepatòcits presenten una alta taxa de transducció [163]. En tercer lloc, un fetge completament desenvolupat i sota condicions normals els hepatòcits romanen en quiescència i només es divideixen al voltant del 1-2% [163], de manera que permet la permanència a llarg termini dels genomes dels AAVs no integrats i la seva expressió. Un altre avantatge és que l'expressió del transgèn en hepatòcits indueix una tolerància específica mediada per cèl·lules T reguladores [164]. Finalment, el fetge és clau en la síntesi i metabolisme d'un gran nombre de proteïnes, tant intracel·lulars com secretades, a més de tenir un rol important en la detoxicació de metabòlits, per tant, és un bon candidat com a diana pel tractament de moltes malalties metabòliques.



### Assajos clínics i pràctica clínica

A l'any 1996, Terence Flotte va promoure el primer assaig clínic de teràpia gènica basat en un rAAV. Concretament, era un rAAV2 que contenia el gen *CFTR* per el tractament de pacients de fibrosi quística amb la malaltia pulmonar lleu [165]. Des de llavors el número d'assajos clínics amb rAAV ha anat incrementant progressivament fins que avui en dia, els rAAV arriben a ser els quarts vectors més utilitzats en assajos clínics. En concret, els rAAV s'han utilitzat en 244 assajos clínics que correspon a un 8,1% dels assajos clínics en basats en tècniques de teràpia gènica (dades actualitzades a desembre de 2019) [106] i en la majoria de casos s'utilitza com a eina terapèutica per la substitució gènica en el tractament de malalties monogèniques recessives. Generalment, el serotip més utilitzat és l'AAV2 però cada vegada s'utilitzen més les càpsides dels AAV8, AAV9, AAVrh10.

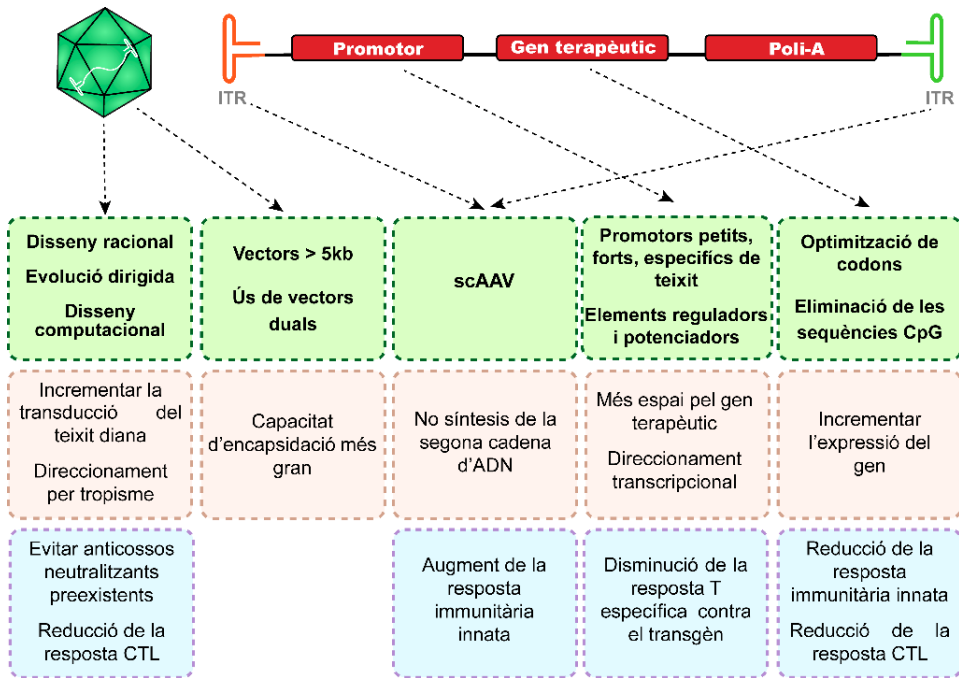
Pel que fa a la seva aprovació per a la pràctica clínica, el primer producte de teràpia gènica autoritzat per una malaltia monogènica va ser *Glybera* (any 2012) on el vector utilitzar era un rAAV [166]. Actualment hi ha 3 productes aprovats per el seu ús en pacients: *Glybera (uniQure)* un rAAV1 pel tractament de la deficiència de la lipoproteïna lipasa, tot i que l'any 2017 es va retirar del mercat degut al seu elevat cost; *Luxturna (Spark Therapeutics)* un rAAV2 pel tractament de l'amaurosis congènita de Leber [167]; i *Zolgesma (AveXis)* un rAAV9 pel tractament per l'atròfia muscular espinal [168].

### 2.2.3. ESTRATÈGIES DE MILLORA DELS rAAV

Encara que els rAAV han assolit un èxit terapèutic en alguns casos [166–168], hi ha alguns problemes derivats de la seva eficiència de transducció i de la seva tendència a induir la resposta immune contra les cèl·lules transduïdes.

Per aquesta raó, s'han desenvolupat diverses estratègies per a millorar l'expressió del gen terapèutic i incrementar-ne la taxa de transducció. En general, es poden agrupar en estratègies orientades a reduir la resposta immune i en altres estratègies per augmentar l'eficiència d'expressió, més enllà de la resposta immune.

Les diferents estratègies d'optimització del vector tenen en compte tots els elements del seu genoma i la seva càpsida (**Figura 2.11**).



**Figura 2.11. Estratègies de millora dels rAAV.** Separades segons l'element del vector que es modifica. En verd està representada la millora, en vermell l'efecte sobre la transducció i en blau el possible efecte sobre la resposta immunitària. scAAV: AAV autocomplementari; CTL: resposta T citotòxica.

## 2.2.3.1. Estratègies de millora fora de la resposta immunitària

### 2.2.3.1.1. Modificació de les ITRs: scAAV.

Un dels passos del cicle viral que més limiten l'eficiència de transducció d'un rAAV és la síntesi de la cadena complementària d'ADN abans de que es pugui iniciar la transcripció. Aquest pas s'inicia en les ITRs i depèn enormement de l'estat fisiològic en el que es trobi la cèl·lula hoste i de la concentració de partícules infectives (ja que pot haver-hi un aparellament de cadenes complementàries si entren un rAAV de cadena negativa i un de cadena positiva) [169].

La necessitat de la conversió a ADN de doble cadena es pot obviar mitjançant l'ús de rAAV autocomplementaris (scAAV, de l'anglès *self-complementary* AAV). Els scAAV presenten un genoma que consisteix en una molècula d'ADN de cadena simple formada per dos monòmers repetits i invertits separats i units per una regió ITR. Aquesta seqüència permet prescindir de la maquinària de replicació de la

cèl·lula hoste, ja que un cop alliberat el genoma scAAV a dins del nucli, les dues meitats de la molècula d'ADN de cadena simple es pleguen i les bases complementàries s'aparellen instantàniament formant un ADN de cadena doble llest per la transcripció i expressió del gen terapèutic [170]. De fet, la utilització de scAAV ha demostrat produir una expressió més ràpida i més alta del gen terapèutic en models animals [171] i en assajos clínics per l'hemofília B (scAAV8) (Clinicaltrials.gov: NCT01687608) [172] i per l'atròfia muscular espinal (scAAV9) (Clinicaltrials.gov: NCT02122952) [173].

Aquest tipus d'estructura genòmica dels scAAV (ITR-transgèn-ITR-transgèn invertit-ITR) (**Pas 5b Figura 2.10**) apareix en un dels passos de la síntesi de l'ADN de cadena doble en el cicle normal dels AAV. L'augment de l'eficiència d'obtenció dels scAAV s'aconsegueix mitjançant l'eliminació del lloc de resolució terminal d'una ITR de manera que la proteïna Rep no pugui generar el tall en l'ADN de cadena simple i resoldre la ITR (aquesta modificació genera aproximadament un 90% de genomes scAAV) [170].

La principal limitació d'aquests vectors és la reducció de la seva capacitat d'empaquetament, que disminueix de 4,7 kb a 2,4 kb. En aquest cas, on la restricció d'espai és encara més important que en els altres rAAV, l'optimització dels diferents elements del casset d'expressió és especialment rellevant. Una altra limitació dels scAAV és que s'ha vist que desencadenen una major resposta immune degut a l'activació de la immunitat innata via TLR9 [174].

#### **2.2.3.1.2. Optimització del casset d'expressió.**

Un dels elements més importants en el casset d'expressió és el promotor. Generalment, resulta més atractiu l'ús de promotors específics de teixit, ja que a part de resultar més efectius en el teixit diana, també permeten dirigir l'expressió a un teixit concret i reduir la resposta immune [163]. Altres elements reguladors que poden incrementar l'expressió són l'ús d'introns [175], o l'element regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis de la marmota (WPRE) [176]. No obstant a vegades, degut a la capacitat d'empaquetament limitada dels rAAV, l'única alternativa és utilitzar promotors més petits per reservar l'espai d'empaquetament per a gens terapèutics grans, com per exemple el factor de coagulació VIII [177] o el

regulador de la conductància transmembrana de la fibrosis quística [178]. En aquests casos, aquests promotors petits es solen combinar amb seqüències potenciadores que actuen afavorint la unió de factors de transcripció [137].

### 2.2.3.1.3. Optimització de la seqüència codificant.

La majoria de transgens terapèutics utilitzats en assajos clínics són derivats de les seqüències naturals dels gens. No obstant, aquesta seqüència es pot optimitzar per obtenir un increment en l'expressió de la proteïna d'interès.

**Taula 2.3. Freqüència d'ús de cada codó en les seqüències codificants en *Homo sapiens***

Codó	Aa	Freq	Codó	Aa	Freq	Codó	Aa	Freq	Codó	Aa	Freq
AAA	K	0,43	AGA	R	0,21	ACA	T	0,28	AUA	I	0,17
AAG	K	0,57	AGG	R	0,21	ACG	T	0,11	AUG	M	1
AAC	N	0,53	AGC	S	0,24	ACC	T	0,36	AUC	I	0,47
AAU	N	0,47	AGU	S	0,15	ACU	T	0,25	AUU	I	0,36
GAA	E	0,42	GGA	G	0,25	GCA	A	0,23	GUA	V	0,12
GAG	E	0,58	GGG	G	0,25	GCG	A	0,11	GUG	V	0,46
GAC	D	0,54	GGC	G	0,34	GCC	A	0,4	GUC	V	0,24
GAU	D	0,46	GGU	G	0,16	GCU	A	0,27	GUU	V	0,18
CAA	Q	0,27	CGA	R	0,11	CCA	P	0,28	CUA	L	0,40
CAG	Q	0,73	CGG	R	0,2	CCG	P	0,11	CUG	L	0,07
CAC	H	0,58	CGC	R	0,18	CCC	P	0,32	CUC	L	0,20
CAU	H	0,42	CGU	R	0,08	CCU	P	0,29	CUU	L	0,13
UAA	*	0,24	UGA	*	0,47	UCA	S	0,15	UUA	L	0,08
UAG	*	0,3	UGG	W	1	UCG	S	0,05	UUG	L	0,13
UAC	Y	0,56	UGC	C	0,54	UCC	S	0,22	UUC	F	0,54
UAU	Y	0,44	UGU	C	0,46	UCU	S	0,19	UUU	F	0,46

*Taula elaborada a partir de les dades de [179]. Aa: Aminoàcid representat amb el codi de 1 lletra; Freq: Freqüència sobre 1 del codó sobre el total de codons que codifiquen aquell aminoàcid. \* senyal de Stop.*

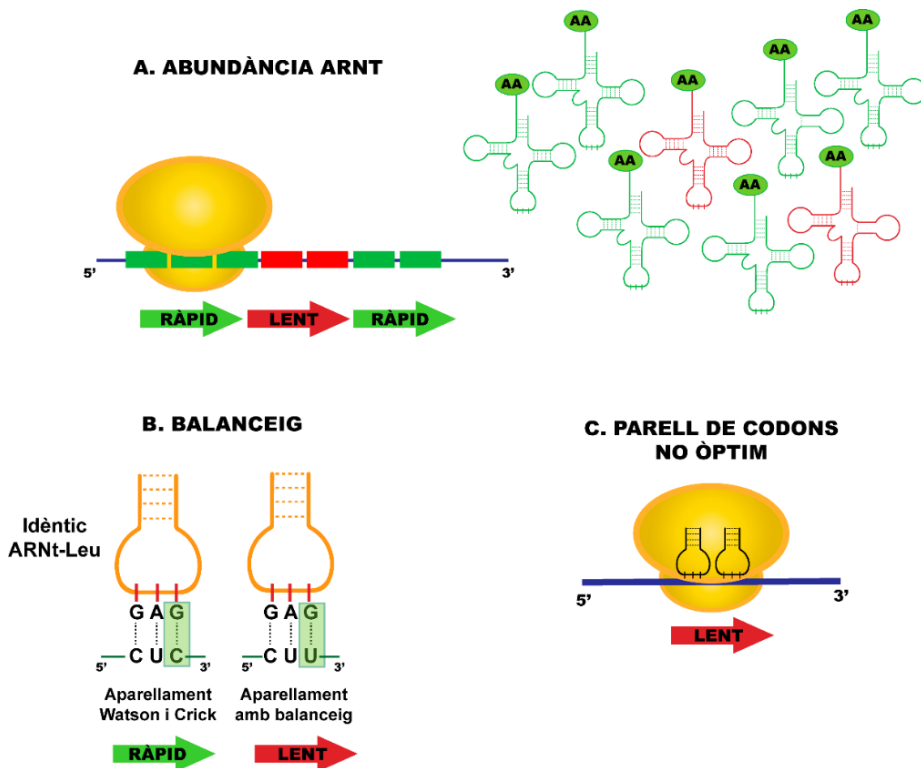
El codi genètic pot utilitzar 64 possibles codons per codificar els 20 aminoàcids i les 3 senyals d'estop. Aquest fet implica que el codi genètic estàndard sigui degenerat, i 18 dels 20 aminoàcids naturals (tots menys la metionina i el triptòfan) estan codificats per més d'un codó (**Taula 2.3**).

En conseqüència, una mateixa proteïna pot ser codificada per molts ARNm diferents, però el nivell d'expressió de la proteïna pot variar enormement entre dues seqüències d'ARNm. En cada espècie hi ha preferència per l'ús de certs codons sobre d'uns altres en les seqüències codificants i per tant, les freqüències d'ús de cada codó sinònim varia. Aquest fet s'anomena biaix en l'ús de codó [180].

A més, els codons amb un biaix més gran es troben preferentment en gens expressats en alt nivell. Això va suggerir que el biaix en l'ús de codó i l'expressió de proteïnes estaven lligats, i per tant que seria possible incrementar l'expressió imitant el patró del l'ús de codó en gens altament expressats [181]. S'ha observat que el biaix en l'ús de codó també correlaciona amb els nivells d'ARNt en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila spp* i eucariotes en general [182]. No obstant, l'ús de codó també pot venir definit per factors independents de la traducció, com per exemple la necessitat d'evitar similitud amb elements funcionals importants de l'ARNm, o evitar senyals de *splicing* [182].

S'ha observat que l'ús de codó pot afectar la quantitat de proteïna produïda degut a diferents mecanismes:

- **Nivells d'ARNt:** la velocitat de descodificació del ribosoma no és uniforme per a cada codó i depèn en part de la quantitat d'ARNt específic de cada codó [183]. A grans trets, un codó és òptim si es pot seleccionar ràpidament el seu ARNt del *pool* citoplasmàtic d'ARNts (**Figura 2.12A**).
- **Balanceig:** L'abundància d'ARNt no és l'únic factor que influeix en la cinètica d'elongació de la traducció. Degut al fenomen del balanceig [47] hi ha ARNt que formen enllaços més dèbils amb l'ARNm i, per tant, aquestes interaccions són menys favorables i els ribosomes hi passen més lentament [182] (**Figura 2.12B**).
- **Interacció entre ARNt:** A més cal destacar que el ribosoma no interacciona amb un sol codó a la vegada, sinó amb dos. També trobem un biaix en les parelles de codons, i algunes parelles tendeixen a evitar-se i altres tendeixen utilitzar-se més (**Figura 2.12C**). En general, les parelles NNUANN estan menys representades que les parelles NNGCNN [184]. Tot i que no es coneix el mecanisme concret, es creu que els dos ARNt que estan presents al ribosoma interaccionen i influeixen en l'eficiència de transducció [185].



**Figura 2.12. Mecanismes de modificació de la velocitat d'elongació de la traducció on estan implicats els ARNt.** **A.** Els ARNt més abundants, associats a codons més freqüents, es tradueixen més ràpid degut a que és més fàcil trobar-los en el pool d'ARNt (els rectangles verds signifiquen codons freqüents i els vermells codons més estranys). **B.** Els codons que impliquen aparellament de bases sense balanceig es tradueixen més ràpid. **C.** Certs parells de codons poden actuar sinèrgicament per reduir la velocitat d'elongació més que la suma dels dos codons per separat.

Tot i que en diversos organismes s'ha observat que el biaix en l'ús de codó és un factor determinant dels nivells de proteïna, i inicialment es va atribuir l'ús de codons més freqüents amb una velocitat més alta de traducció per part del ribosoma, la relació entre l'ús de codó i l'eficiència de traducció no està tan clara, ja que l'ús de codó pot influenciar en altres factors a part de la velocitat d'elongació:

- **Estabilitat dels ARNm:** s'ha relacionat l'ús de codó amb l'estabilitat dels ARNm en *E.Coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, peix zebra i en línies cel·lulars de ratolí, de rata i humanes, suggerint que l'ús de codó és un mecanisme conservat de regulació de l'estabilitat dels ARNm [182,186,187].

- **Estabilitat de l'inici de la traducció:** l'energia de plegament de l'ARNm, especialment a prop del codó inici, té un impacte en l'eficiència de traducció, ja que estructures més estables requereixen més energia per desplegar-se i poder iniciar la traducció [188] i, en general, la iniciació és el pas limitant de la traducció [189,190]. Si la iniciació és el coll d'ampolla, qualsevol increment en la velocitat d'elongació simplement comportarà una finalització més ràpida de la síntesi però no un increment en la quantitat de proteïna produïda per molècula d'ARNm. No obstant, si es redueix la velocitat d'elongació amb codons menys freqüents, aquesta pot arribar a ser limitant per la traducció [191].
- **Plegament de les proteïnes:** els codons no òptims poden servir per reduir la velocitat de traducció en motius estructurals claus per facilitar el seu plegament. També hi ha evidències que en els dominis funcionals es solen utilitzar codons òptims, on és menys probable que hi hagi equivocacions, per evitar mutacions, i en les zones d'unió entre dominis, hi ha una acumulació més alta de codons no òptims, per baixar la velocitat de traducció i permetre un plegament correcte dels dominis [182,192].

### *Optimització de codons i teràpia gènica*

En teràpia gènica, l'optimització de codons consisteix en utilitzar el biaix de l'ús de codó mantenint la seqüència d'aminoàcids per millorar la composició de codons d'un gen recombinant i augmentar la producció de la proteïna codificada. No obstant, l'èxit d'aquest procediment varia segons el gen i l'eina utilitzada per a fer-ho. S'han observat variacions entre 0,8 i 15 vegades l'expressió del gen sense modificar [193].

Un paràmetre útil per analitzar l'ús de codó d'un gen concret és l'índex d'adaptació de codó (CAI), que té un valor d'1 quan en cada posició d'un gen s'utilitza el codó més freqüent [194].

Han aparegut moltes eines i algorismes per optimitzar l'expressió d'un gen. La majoria d'aquestes eines intenten millorar el CAI evitant la utilització de codons poc freqüents. A partir d'aquí tenen en compte altres paràmetres, com evitar la presència de motius d'inestabilitat de l'ARNm, reduir l'estabilitat d'estructures secundaries de l'ARNm, evitar codons inici alternatius, evitar la presència dels parells de codons que

se sap que tradueixen lentament, mantenir regions que són importants pel plegament de la proteïna, evitar codons stop en marcs de lectura alternatius, evitar regions amb un percentatge molt alt o molt baix de GC i preservar els llocs acceptors i donadors de *splicing*. [195–197].

#### 2.2.3.1.4. Increment de la capacitat d'empaquetament

Una de les limitacions més important dels rAAV és que no es poden utilitzar cassets d'expressió més grans de 5 kb (i en el cas dels scAAV, 2,4 kb), ja que disminueixen molt el rendiment de producció viral. La limitació d'espai es pot superar utilitzant dues estratègies principalment. La primera consisteix en utilitzar cassets d'expressió més grans de 5kb flaquejats per ITRs. Durant la producció del vector s'empaqueten genomes heterogenis, majoritàriament truncats a 5 kb. [198]. Una segona estratègia és la utilització de rAAVs duals, que consisteix en separar el transgèn terapèutic gran en dues meitats i empaquetar una meitat a cada vector [199]. La formació del transgèn complet té lloc quan coinfecten la mateixa cèl·lula els dos rAAV per recombinació homòloga o per formació de concatèmers via ITRs [122].

#### 2.2.3.1.5. Optimització de la càpsida

S'utilitzen 3 estratègies bàsiques per millorar la transducció mitjançant optimització de la càpsida:

- **Disseny racional.** En alguns serotips s'han identificat els dominis de la càpsida responsables de la unió a la cèl·lula. El coneixement de les seqüències de les proteïnes de la càpsida i la seva estructura han permès el disseny racional de càpsides per incrementar la transducció.
- **Evolució directa.** Les tècniques d'evolució directa de les càpsides que s'han utilitzat per desenvolupar rAAVs inclouen PCR propensa a errors, barreja gènica, recombinació dirigida de fragments de proteïna (una estratègia que combina disseny racional i evolució directa), evolució directa d'AAV per recombinació basada en Cre (CREATE) i evolució directa *in vivo*.
- **Disseny computacional.** Es poden generar noves càpsides amb una capacitat de transducció millorada utilitzant el disseny computacional. La reconstrucció de seqüències ancestrals permet explorar potencials seqüències d'aminoàcids noves que presentin propietats noves o millorades



quant a termoestabilitat, unió a nous substrats o una solubilitat més alta, entre d'altres [137,143].

#### 2.2.3.1.6. Optimització del procés de transducció

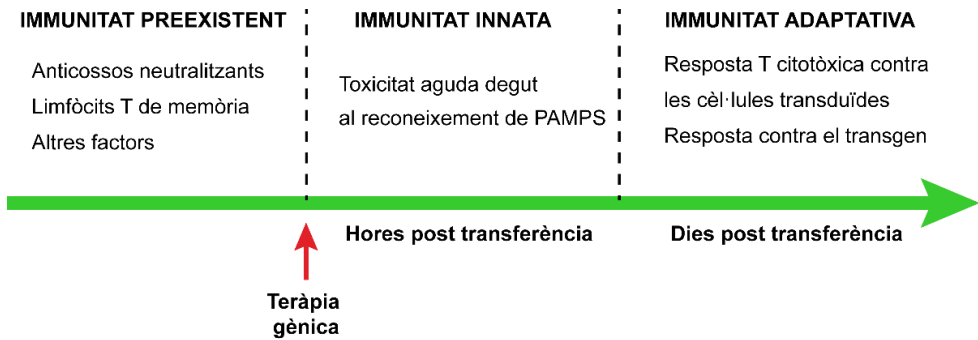
Altres estratègies per millorar el procés de transducció del virus en altres etapes del cicle víric consisteixen en l'escapament endosomal i el tràfic intracel·lular. S'ha observat l'administració d'inhibidors del proteosoma incrementen la transducció de rAAV en el fetge de ratolins, entre d'altres compostos. La interacció de proteïnes dels sèrum també pot incrementar o disminuir la transducció dels rAAVs [137].

#### 2.2.3.2. Estratègies dins la resposta immunològica

La resposta immune de l'hoste en front els rAAV és una barrera important per aconseguir una expressió duradora i efectiva del gen terapèutic, i inclou anticossos neutralitzants preexistents contra els virions dels AAV, resposta immunològica innata contra elements del vector, i resposta dels limfòcits T citotòxics (CTL) contra la càpsida i contra la proteïna terapèutica. Per tant, la modificació del vector per evadir la resposta immune de l'hoste és de gran utilitat per aconseguir una transducció més eficient. La resposta immune dependrà de la ruta d'administració del vector, de la dosi, dels diferents elements del genoma del vector i de la càpsida.

La resposta immunitària es divideix en dues fases.

- **La immunitat innata:** és ràpida, no específica i no desencadena una memòria immunitària. S'inicia degut al reconeixement de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs: de l'anglès *Pathogen-associated molecular pattern*) per part dels receptors reconeixadors de patrons presents a les cèl·lules immunològiques.
- **La immunitat adaptativa:** té lloc després de la innata i permet el reconeixement i eliminació d'antígens específics, així com la generació de memòria. La resposta adaptativa es divideix en resposta m per limfòcits B i limfòcits T. Després de la seva activació, els limfòcits es diferencien a cèl·lules efectores i promouen la destrucció dels antígens amb la inducció de la resposta humoral i citotòxica.



**Figura 2.13. Resposta immunitària del hoste contra els rAAV.** Abans de la teràpia gènica, els pacients poden haver estat exposats a AAV i desenvolupar una resposta humoral i citotòxica cap al vector. Immediatament després de l'administració del rAAV es pot desencadenar una resposta immunitària innata. Finalment, hi pot haver una resposta adaptativa tant contra la càpsida com contra el transgèn que generi memòria. PAMPS: Patrons moleculars associats a patògens.

### 2.2.3.2.1. Evasió de la resposta immune innata

El genoma del rAAV pot desencadenar la resposta innata a través de diferents vies:

- Les seqüències CpG no metilades típiques d'ADNs vírics i bacterians són reconegudes pel receptor *Toll-like* 9 (TLR9) present en els endosomes de les cèl·lules de Kupffer, i cèl·lules dendrítiques. L'activació de TLR9 condueix a la presentació dels antigens de la càpsida via complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe I i indueix la resposta immune caracteritzada per una infiltració de neutròfils, macròfags i cèl·lules NK (*Natural Killer*) en fetge, l'expressió de gens proinflamatoris i l'increment d'IL-6 circulant [174]. En rAAV on s'han eliminat totes les seqüències CpG s'ha observat que l'activació de la resposta immunitària és menor, conduint a una expressió estable del gen terapèutic després d'una injecció intramuscular del vector [200]. En canvi, s'ha descrit que el genoma scAAV indueix una resposta immunitària major també per aquesta via [174].
- Recentment, s'ha descrit que l'activitat promotora de les ITRs pot generar ARN de doble cadena, que pot ser detectat pel sensor MDA5 dels hepatòcits i conduir a l'expressió d'interferó tipus I. El bloqueig de MDA5 disminueix l'expressió d'interferó i incrementa l'expressió *in vitro* [201].

### 2.2.3.2.2. Evasió de la resposta immune adaptativa

#### *Resposta B. Anticossos neutralitzants preexistents*

Els humans estem exposats a AAV durant tota la vida i en conseqüència els anticossos contra els AAV són molt prevalents en la població. La preexistència d'anticossos totals, que generalment correlacionen amb els anticossos neutralitzants [202], està al voltant del 70% contra els AAV1 i AAV2, del 45% contra els AAV6 i AAV9 i del 40% contra els AAV5 i AAV8 [203]. Tot i així, hi pot haver una reacció creuada entre anticossos neutralitzants de diferents serotips degut a l'alta homologia de seqüència de les càpsides [204].

Hi ha vàries aproximacions per reduir els títols d'anticossos neutralitzants com l'ús d'agents farmacològics (rituximab o rapamicina) que impedeixen la formació d'anticossos als limfòcits B, la plasmafèresi, cobrir els virions de rAAV amb lípids per a impedir el reconeixement dels anticossos neutralitzants o la utilització de virions buits per segrestar els anticossos presents. No obstant, aquestes estratègies tenen poca eficiència, poden canviar el tropisme o augmentar la resposta immune mediada per cèl·lules T [205].

Una altra aproximació consisteix en dissenyar la càpsida per a que elimini els epítops que interaccionen amb els anticossos neutralitzants. Tot i això, actualment, la majoria d'assajos clínics exclouen aquells pacients que presenten anticossos neutralitzants.

#### *Resposta T citotòxica contra la càpsida i contra la proteïna terapèutica*

Un cop internalitzat, el virió pot entrar al nucli o bé ser ubiquitinat per la seva degradació al proteosoma. En aquest cas, les pèptids de la càpsida s'uneixen a les molècules MHC-I i es transporten a la superfície cel·lular per a ser presentades i resultant en el destrucció de les cèl·lules transduïdes per part dels limfòcits T citotòxics i per tant resultant amb una pèrdua d'expressió del casset terapèutic.

Per evitar aquesta via, s'han utilitzat inhibidors del proteosoma que han demostrat eficàcia in vitro, i també s'ha descrit que la mutació de certs residus de lisina, tirosina o serina que poden ser fosforilats i marcats per la ubiquitinació incrementa la taxa de transducció en línies cel·lulars i en fetge de ratolí [206].

També hi ha el risc d'una resposta immunitària contra la proteïna codificada pel gen terapèutic, i aquesta resposta està influenciada pel teixit diana i la ruta d'administració. De manera general, s'ha observat que injeccions intramusculars amb promotors constitutius produeixen una resposta immunitària major que injeccions sistèmiques de rAAV amb promotors específics hepàtics. El fetge proporciona un ambient immunitari privilegiat i l'expressió de l'antigen en hepatòcits pot promoure la seva tolerància via mecanismes que impliquen a les cèl·lules T reguladores [154].

També tenen importància altres factors com el serotip, la dosi i el disseny del vector. Com en el cas dels antígens de la càpsida, les estratègies es basen en evitar la presentació dels antígens en el MHC-I. La utilització de promotors específics de teixit limiten l'expressió de la proteïna a les cèl·lules diana, evitant l'expressió en cèl·lules dendrítiques presentadores d'antigen [137]. També s'han fusionat als gens terapèutics alguns pèptids virals presents en altres virus, com la glicoproteïna US6 de citomegalovirus o la proteïna ICP47 de herpesvirus que inhibeixen la via de presentació d'antigen per evitar l'eliminació de cèl·lules transduïdes degut a la resposta T citotòxica [207].

## 2.3. MNGIE I TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica resulta una estratègia terapèutica especialment adient pel tractament de MNGIE per diverses raons:

- El MNGIE és una **malaltia monogènica**.
- La falta de TP provoca una acumulació sistèmica de dThd i dUrd, molècules petites i solubles que difonen a través de la membrana cel·lular per transportadors, cosa que afavoreix la seva distribució sistèmica. Per tant, no cal un **òrgan diana concret** per a la teràpia. Com s'ha observat, tant el transplantament hematopoètic de cèl·lules mare com el transplantament de fetge són estratègies terapèutiques vàlides per restaurar els nivells de nucleòsids.
- **El llindar terapèutic és baix**, ja que com es veu en els individus portadors heterozigots, que tenen un 25%-50% de l'activitat TP normal, no presenten simptomatologia de la malaltia.

En conseqüència, en el nostre grup s'han desenvolupat dues estratègies diferents de teràpia gènica. La primera consisteix en la teràpia gènica *ex vivo* mitjançant l'ús de LVs dirigits al teixit hematopoètic i la segona consisteix en teràpia gènica *in vivo* mitjançant un rAAV dirigit al fetge.

### 2.3.1. TERÀPIA GÈNICA *EX VIVO* AMB UN LV DIRIGIT AL TEIXIT HEMATOPOÈTIC.

Com a primera estratègia per la teràpia gènica pel MNGIE, es va crear un LV de tercera generació SIN que contenia l'ADN codificant (ADNc) del gen *TYMP* sota el control del promotor constitutiu de la fosfoglicerat quinasa humana (hPGK). En primer lloc es va testar aquest vector per tractar cèl·lules limfoblastoïdes derivades de 2 pacients de MNGIE i els resultats van demostrar que aquest vector era capaç de restituir l'activitat enzimàtica TP en les cèl·lules transduïdes i prevenir l'acumulació de nucleòsids en un medi de cultiu amb l'addició de dThd i dUrd exògenes [96].

Aquest vector es va testar *in vivo* en el model de ratolí *Tymp<sup>-/-</sup> Upp1<sup>-/-</sup>*. Es van trasplantar amb cèl·lules mare hematopoètiques de ratolins transduïdes amb el LV, i es van obtenir activitats TP altes en sang perifèrica associats a una reducció de la concentració de nucleòsids en plasma amb baixos nivells de quimerisme [96]. Posteriorment, es va demostrar que aquest tractament és estable a llarg termini (almenys 18 mesos) i no presenta efectes tòxics derivats del propi vector, tot i que hi va haver un augment de mortalitat en ratolins tractats degut al procediment de transplantament [99]. Recentment, en un altre estudi per optimitzar el vector, el transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques transduïdes va aconseguir incrementar la correcció bioquímica [208].

Aquesta aproximació va demostrar la viabilitat d'un tractament basat en teràpia gènica pel MNGIE. No obstant, aquesta estratègia presenta algunes limitacions. Tot i els diferents avanços de seguretat que hi ha hagut en els LVs, encara existeix el risc de mutagènesi per inserció associat a la naturalesa integrativa del vector. A més, el transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques requereix que els pacients siguin sotmesos a un condicionament mieloablatiu tòxic, i moltes vegades contraindicat en el cas del pacients de MNGIE.

### 2.3.2. TERÀPIA GÈNICA *IN VIVO* AMB UN rAAV DIRIGIT AL FETGE

Amb l'experiència obtinguda de la teràpia gènica lentiviral, i les seves limitacions associades es va decidir avaluar una segona alternativa de teràpia gènica basada en un rAAV dirigit al fetge. L'elecció del fetge com a òrgan que destoxica els nucleòsids respon al fet que és un teixit que en controls sans presenta una activitat TP alta [55]. De cara a la teràpia gènica, és un teixit interessant ja que té un ambient immunotolerant que prevé la resposta immune en front a l'expressió de proteïnes desconegudes i, a més, molts dels serotips d'AAVs tenen tropisme hepàtic [153,164].

En aquest cas, es va escollir un AAV8, que presenta tropisme hepàtic, que contenia l'ADNc de *TYMP*, sota la influència del promotor hepàtic de la globulina fixadora de tiroxina (TBG). Aquest vector va demostrar una restitució completa de l'homeòstasi bioquímica a més de no presentar toxicitat hepàtica ni a curt [98] ni a llarg termini [99] en el model de ratolí de la malaltia *Tymp<sup>-/-</sup>Upp1<sup>-/-</sup>*. Posteriorment, es va optimitzar la seqüència promotora del vector, i es va determinar que el promotor que resultava més efectiu en restituir el fenotip bioquímic de la malaltia en el model dKO era el de la  $\alpha$ -1-antitripsina (AAT) [100].

Tot i els bons resultats, aquest vector només ha demostrat una correcció bioquímica en el model de la malaltia, i gràcies a la descripció d'un nou model que presenta uns lleus trets del fenotip clínic de la malaltia [104] i de cara a la translació a la practica clínica és important demostrar la capacitat de correcció d'altres trets fenotípics. Donat que recentment s'ha descrit un model millorat de la malaltia, en aquesta tesi, s'ha testat la capacitat del vector per corregir també aquestes condicions.

Un altre aspecte important és que, a diferència dels ratolins, la resposta immunològica en humans és una limitació important en la utilització d'aquests vectors [209]. Per aquesta raó, l'obtenció de vectors que puguin funcionar a dosis menors constituirà un avenç molt important per optimitzar el tractament de pacients. En aquest sentit, és molt important incorporar, en tots els elements del vector, tantes millores com sigui possible per incrementar la seva eficàcia i bioseguretat. Amb l'objectiu de seguir millorant el vector, en aquesta tesi s'ha testat una bateria de seqüències codificants de *TYMP* optimitzades per la seva expressió i per reduir la seva immunogenicitat per poder escollir aquella que resulti més efectiva



# 3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

---





### 3.1. HIPÒTESIS

Estudis anteriors del nostre grup demostren que la teràpia gènica consistent en una sola administració d'un rAAV8 dirigit transcripcionalment al fetge restitueix l'homeòstasi bioquímica en el model de ratolí dKO de MNGIE (*Tymp<sup>-/-</sup> Upp1<sup>-/-</sup>*). Però abans de portar aquest tractament a la clínica és necessari continuar la recerca preclínica en diversos punts.

Aquesta tesi planteja dues hipòtesis relacionades, que donaran lloc a dos blocs d'objectius.

En primer lloc, el fenotip del model murí dKO està limitat a alteracions bioquímiques, però una exposició oral crònica dels ratolins a dThd i dUrd al llarg de la seva vida magnifica les alteracions bioquímiques i genera en els animals alteracions que mimetitzen en part el fenotip clínic dels pacients. **La hipòtesi 1 postula que la nostra estratègia basada en el tractament amb un rAAV que conté la regió codificant de *TYMP* serà capaç de prevenir els trets fenotípics exacerbats en el model dKO exposat a nucleòsids, incloent-hi les alteracions que mimetitzen la presentació clínic dels pacients.**

En segon lloc, una millora del vector podria reduir la dosi necessària per obtenir eficàcia terapèutica. **La hipòtesi 2 postula que l'optimització dels codons de *TYMP* permetrà generar més activitat TP per cada unitat de vector, i que l'eliminació de les seqüències CpG de la seqüència codificant, cosa que disminueix la resposta immunitària contra el vector, no alterarà de manera significativa l'expressió del gen.**

Si es confirma la primera hipòtesi, s'haurà demostrat per primera vegada que la teràpia gènica pel MNGIE basada en rAAV, a part de restituir l'homeòstasi bioquímica, permet prevenir en el model animal el desenvolupament de trets fenotípics similars a la presentació clínic de la malaltia. La confirmació de la segona hipòtesi augmentaria la seguretat de la teràpia, ja que una dosi menor suposa una disminució dels seus possibles efectes secundaris.

## 3.2. OBJECTIUS

Els objectius per a la verificació de les hipòtesis plantejades són:

### Objectius derivats de la hipòtesi 1

- Objectiu 1.1     Caracteritzar els efectes de l'exposició crònica a dThd i dUrd en el model dKO de ratolí de MNGIE sobre l'homeòstasi dels nucleòsids i sobre els altres trets fenotípics que van ser descrits en la descripció inicial d'aquest model exposat.
- Objectiu 1.2     Tractar els ratolins exposats amb l'administració intravenosa de diferents rAAV dirigits al fetge a diferents dosis i estudiar els efectes del tractament sobre les variables definides a partir de l'objectiu 1.1.
- Objectiu 1.3     A partir dels resultats obtinguts en l'objectiu 1.2, comparar l'eficàcia assolida utilitzant els diversos promotors hepàtics en els rAAVs dirigits al fetge.

### Objectius derivats de la hipòtesi 2

- Objectiu 2.1     Dissenyar diferents variants de la seqüència codificant de *TYMP* optimitzant els codons i determinar *in vitro* l'efecte d'aquestes modificacions de seqüència sobre la seva expressió utilitzant diverses línies cel·lulars.
- Objectiu 2.2     Determinar l'efecte de l'eliminació dels dinucleòtids CpG de la seqüència codificant de *TYMP* amb l'objectiu de reduir la seva immunogenicitat, i en concret si aquesta modificació dona lloc a un augment o disminució de l'expressió del transgèn.

### Objectiu global

- Objectiu 3        A partir dels resultats obtinguts en tots els objectius anteriors, establir quina de les diferents construccions del vector s'hauria de considerar preferentment per al seu ús posterior en assajos clínics en pacients de MNGIE.

## **4. MATERIALS I MÈTODES**

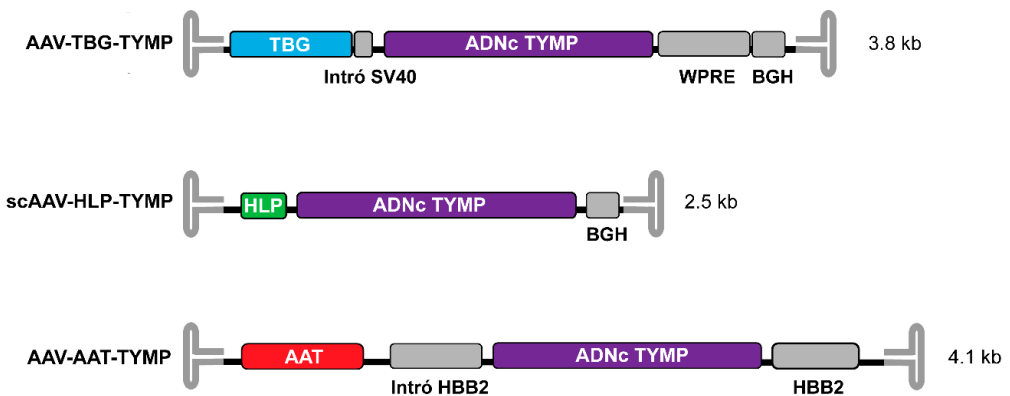
---



## 4.1. DISSENY EXPERIMENTAL

### 4.1.1. TERÀPIA GÈNICA DE RATOLINS SOBREEXPOSATS A NUCLEÒSIDS

L'estudi consisteix en exposar els ratolins als nucleòsids 16,6 g/L de dThd i de dUrd a la beguda des del deslletament fins al final de l'estudi (22 mesos) i avaluar l'efecte del tractament amb 3 rAAVs diferents (**Figura 4.1**). Aquests vectors havien estat construïts, produïts i titulats prèviament [98,100]. En tots els casos, es va utilitzar el serotip AAV2/8, i es diferencien entre ells en el promotor utilitzat i en què un d'ells té una conformació autocomplementària (scAAV).



**Figura 4.1. Representació esquemàtica dels rAAV.** TBG: promotor de la globulina fixadora de tiroxina; Intró SV40: intró del virus simi 40; WPRE: Element posttranscripcional regulador del virus de l'hepatitis de la marmota; BGH: Senyal de poliadenilació de la hormona de creixement bovina; HLP: promotor híbrid específic de fetge; AAT: promotor de la  $\alpha$ -1-antitripsina humana; intró HBB2: intró de de la subunitat  $\beta$ -2 de l'hemoglobina bovina; HBB2: senyal de poliadenilació de la subunitat B-2 de l'hemoglobina bovina.

Entre les edats de 8 i 10 setmanes, s'administra una única injecció a la vena caudal amb els rAAVs a la dosi de  $5 \cdot 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \cdot 10^{12}$  i  $10^{13}$  còpies del vector per kilogram de ratolí (vg/kg), pel vector AAV-TBG, i a les dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  i  $10^{13}$  vg/kg pels vectors AAV-AAT i AAV-HLP. Els grups d'animals de l'estudi estan detallats a la **Taula 4.1**.

**Taula 4.1. Grups d'animals de l'estudi**

Grup	Genotip	Sobrecàrrega de nucleòsids	Tractament amb adenoassociats
WT	WT	NO	NO
WT exposat	WT	SI	NO
dKO	dKO	NO	NO
dKO exposat	dKO	SI	NO
TBG-5·10 <sup>11</sup>	dKO	SI	AAV2/8-TBG-TYMP. Dosi 5·10 <sup>11</sup> vg/kg <sup>1</sup>
TBG-10 <sup>12</sup>	dKO	SI	AAV2/8-TBG-TYMP. Dosi 10 <sup>12</sup> vg/kg
TBG-2·10 <sup>12</sup>	dKO	SI	AAV2/8-TBG-TYMP. Dosi 2·10 <sup>12</sup> vg/kg
TBG-10 <sup>13</sup>	dKO	SI	AAV2/8-TBG-TYMP. Dosi 10 <sup>13</sup> vg/kg
AAT-2·10 <sup>12</sup>	dKO	SI	AAV2/8-AAT-TYMP. Dosi 2·10 <sup>12</sup> vg/kg
AAT-10 <sup>13</sup>	dKO	SI	AAV2/8-AAT-TYMP. Dosi 10 <sup>13</sup> vg/kg
HLP-2·10 <sup>12</sup>	dKO	SI	scAAV2/8-HLP-TYMP. Dosi 2·10 <sup>12</sup> vg/kg
HLP-10 <sup>13</sup>	dKO	SI	scAAV2/8-HLP-TYMP. Dosi 10 <sup>13</sup> vg/kg

<sup>1</sup> Genomes del vector per kilogram d'animal (vg/kg).

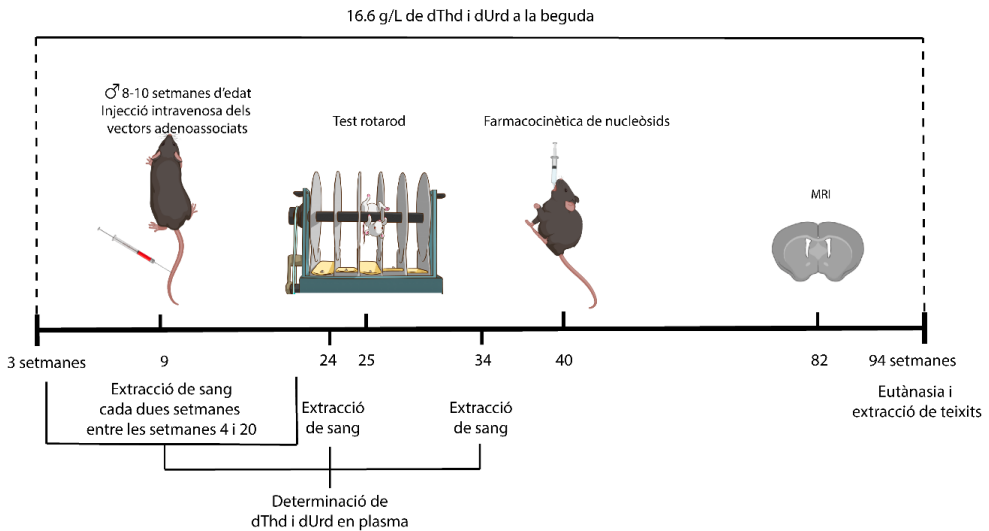
AAT: promotor de l'alfa-1-antitripsina; dKO: doble knock-out; HLP: promotor hepàtic híbrid; scAAV: AAV autocomplementari; TBG promotor de la globulina fixadora de tiroxina; WT: wild-type

A la **Figura 4.2** hi ha una representació esquemàtica del disseny d'aquest estudi. Durant tot l'estudi es fa un seguiment setmanal del pes i del benestar dels animals. També es monitoritzen els nucleòsids dThd i dUrd en plasma a través d'extraccions periòdiques de sang de la vena safena (apartat 4.8.4). El seguiment es fa cada dues setmanes entre les setmanes 4 i 20, i després als 6 i 8 mesos d'edat de l'animal.

A les 25 setmanes s'avalua la coordinació motora amb el test Rotarod (apartat 4.8.5).

A les 40 setmanes es realitza un estudi d'absorció en sang dels nucleòsids durant un període de 8 hores que consisteix una administració aguda oral dels nucleòsids dThd i dUrd seguida de 7 extraccions de sang a diferents temps post administració on es determinen els nivells plasmàtics de nucleòsids (apartat 4.8.4.1).

Entre les 80 i 84 setmanes es realitza s'obtenen imatges ponderades en T2 d'alta resolució del cervell mitjançant MRI, a continuació es mesura el volum dels ventricles cerebrals utilitzant mapes de T2 (apartat 4.8.6).



**Figura 4.2.** Representació esquemàtica del disseny de l'estudi de la teràpia gènica amb ratolins exposats a sobrecàrrega de dThd i dUrd.

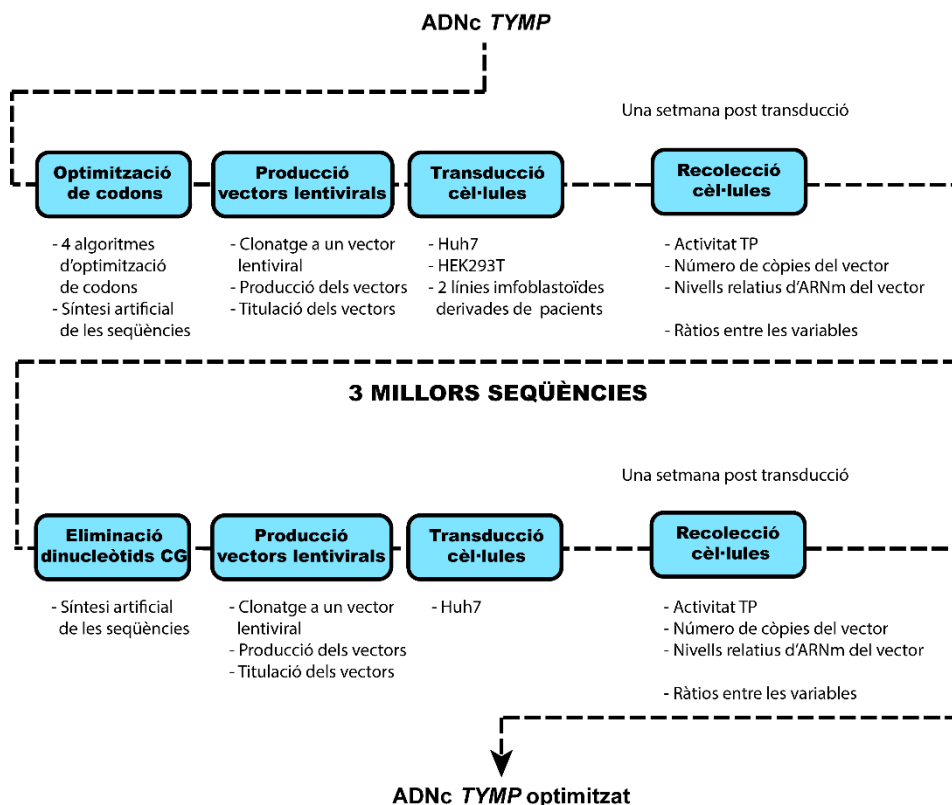
A les 94 setmanes es sacrifiquen els animals per a l'obtenció de mostres (apartat 4.8.7) i s'avaluen les següents variables:

- Concentració dels nucleòsids dThd i dUrd en plasma, fetge, cervell i intestí prim (apartat 4.4.1).
- Activitat TP en fetge, cervell, múscul esquelètic i intestí prim (apartat 4.4.2).
- Concentració de dNTPs mitocondrials en fetge i cervell (apartat 4.4.3).
- Número de còpies del vector en fetge, cervell, múscul esquelètic i intestí prim (apartat 4.3.1).
- Número de còpies de l'ADNmt en cervell i intestí prim (apartat 4.3.1).
- Anàlisi histològica de l'intestí prim (apartat 4.7.2).

#### 4.1.2. DISSENY I ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES OPTIMITZADES DE L'ADN CODIFICANT DE *TYMP*

L'estudi consisteix en avaluar l'eficiència d'expressió de diferents modificacions sobre la seqüència codificant de *TYMP* en varis models cel·lulars. A la **Figura 4.3** es troba una representació esquemàtica.





**Figura 4.3. Representació esquemàtica del disseny de l'estudi d'optimització de la seqüència codificant de TYMP.**

Es dissenyen 4 seqüències modificades per optimització de codons de l'ADNc de TYMP utilitzant 4 algorismes d'optimització diferents. A continuació es clonen en un plasmidi lentiviral i es produeixen els 4 lentivirus.

Les línies cel·lulars Huh7, HEK293T i dues línies cel·lulars limfoblastoïdes immortalitzades (LCLs) derivades de pacients de MNGIE es transdueixen amb cadascun dels 4 LVs amb la seqüència optimitzada o amb el LV amb la seqüència WT a una MOI de 10. Una setmana post transducció es recullen les cèl·lules i es separen en 3 alíquotes per determinar 3 variables:

- Activitat TP (apartat 4.4.2).
- Número de còpies del vector (apartat 4.3.1).
- Nivells d'ARNm del vector (apartat 4.3.2).

Posteriorment es calculen els ràtios entre aquestes variables per a calcular quin vector expressa més eficientment la proteïna TP.

Tot i que en ratolins, la resposta immune no és molt important, és esperable que sigui molt alta en humans, per tant, vam decidir fer el mateix estudi en 3 seqüències sense dinucleòtids CpG, que són dominis immunògens. Com anteriorment, es dissenyen les seqüències, es clonen en un plasmidi lentivirals i es produeixen els vectors. A continuació, es transdueix la línia cel·lular Huh7, amb cadascun dels 3 LVs amb la seqüència modificada sense CpG o amb el LV amb la seqüència WT a una MOI de 10. Una setmana post transducció es recullen les cèl·lules i es separen en 3 alíquotes per determinar 3 variables:

- Activitat TP (apartat 4.4.2).
- Número de còpies del vector (apartat 4.3.1).
- Nivells d'ARNm del vector (apartat 4.3.2).

Posteriorment es calculen els ràtios entre aquestes variables per a calcular quin vector expressa més eficientment la proteïna TP.

## 4.2. METODOLOGIA GENERAL

### 4.2.1. EXTRACCIÓ D'ADN

#### 4.2.1.1. Extracció d'ADN plasmídic per miniprep

Aquest mètode s'utilitza per a obtenir ADN plasmídic d'un cultiu bacterià a petita escala. S'utilitza el *kit* comercial *Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit (28-9042-69, GE Healthcare)*. Es parteix d'un cultiu bacterià de la soca d'*E. coli* que conté el plasmidi desitjat en medi Luria Bertani (LB) (*Luria Broth Base, 12795-027 Invitrogen*) líquid (5 ml) suplementat amb ampil·lina o kanamicina (en funció de la resistència del plasmidi) a una concentració 100 µg/ml. S'incuba 14-16 hores a 37°C i amb agitació a 180 rpm. Es sedimenten els bacteris de 3 ml d'aquest cultiu per centrifugació durant 30 segons a 16.000 x g. Per a l'obtenció de l'ADN plasmídic es segueix el protocol descrit en el manual del *kit*. Un cop obtingut l'ADN es quantifica la concentració d'ADN obtingut (apartat 4.2.3) i es guarda a -20°C fins a la seva posterior utilització.

#### 4.2.1.2. Extracció d'ADN plasmídic per maxiprep

Aquest mètode s'utilitza per a obtenir ADN plasmídic d'un cultiu bacterià a gran escala s'utilitza el *kit* comercial *E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid Maxi Kit (D6926-03, Omega Bio-tek®)*. En primer lloc, es parteix d'un cultiu de 250 ml bacterià de la soca *E. coli* que conté el plasmidi desitjat en medi LB líquid suplementat amb ampicil·lina o kanamicina (en funció de la resistència del plasmidi) a una concentració 100 µg/ml. S'incuba tota la nit a 37°C amb una agitació de 180 rpm. Per a l'obtenció de l'ADN plasmídic es segueix el protocol descrit en el manual del *kit*. Un cop obtingut l'ADN es quantifica la concentració d'ADN obtingut (apartat 4.2.3) i es guarda a -20°C fins a la seva posterior utilització.

#### 4.2.1.3. Extracció d'ADN total per fenol-cloroform

El mètode d'extracció d'ADN total per fenol-cloroform està basat en el mètode descrit per Sambrook i col·laboradors [210]. El protocol és el següent:

- Digerir la mostra (aproximadament 20 mg de teixit polvoritzat (apartat 4.8.7)) amb l'addició de 200 µl de tampó de lisi (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; 0,5% (p/v) SDS) i 50 µl de proteïnasa K (concentració inicial 20 mg/ml) i incubar 2 hores a 50°C o tota la nit (ON) a 37°C en un bany.
- Afegir 25 µl de NaCl 5M i mesclar per inversió.
- Afegir 1 volum (275 µl) de fenol equilibrat amb 10mM Tris-HCl. Agitar per inversió enèrgicament.
- Centrifugar a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C. Recuperar el sobrenedant aquós i transferir-lo a un tub nou.
- Afegir 250 µL de fenol i 250 µL d'una solució d'alcohol isoamílic amb cloroform (1:24) (SEVAG).
- Centrifugar a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C. Recuperar el sobrenedant aquós i transferir-lo a un tub nou.
- Afegir 500 µL de SEVAG.
- Centrifugar a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C. Recuperar el sobrenedant aquós i transferir-lo a un tub nou.
- Precipitar l'ADN amb l'addició de 1 ml d'isopropanol fred (-20°C). Mesclar per inversió i incubar en gel durant 10 minuts.

- Centrifugar a 20.000 x g durant 20 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i rentar el precipitat d'ADN amb 1 ml d'etanol 70%.
- Centrifugar a 20.000 x g durant 20 minuts a 4°C.
- Eliminar completament el sobrenedant i deixar assecat amb el tub obert a temperatura ambient.
- Resuspendre l'ADN en 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8. Incubar a temperatura ambient (TA) fins que es dissolgui.
- Es quantifica la concentració d'ADN obtingut (apartat 4.2.3) i es guarda a -20°C fins a la seva utilització.

#### 4.2.1.4. Extracció d'ADN total per fenol-cloroform simplificat

Aquest protocol s'utilitza per a obtenir ADN a partir de sediments cel·lulars i també per a obtenir ADN genòmic a partir de petits fragments d'orella o cua de ratolí pel genotipatge dels ratolins. El protocol consisteix en:

- Digerir la mostra amb l'addició de 400 µl de tampó de lisi (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 0,5% (p/v) SDS) i 8 µl de proteïnasa K (concentració inicial 20 mg/ml).
- Incubar un mínim de 5 hores a 55°C o tota la nit (ON) a 37°C.
- Afegir 75 µl de 8 M KAc i mesclar amb vòrtex.
- Afegir 500 µl de cloroform i mesclar per inversió.
- Centrifugar a 13.000 x g durant 5 minuts a TA i transferir la fase aquosa (superior) a un tub nou.
- Afegir 2 volums d'etanol 100%, mesclar per inversió i centrifugar a 13.000 x g durant 20 minuts a TA.
- Eliminar el sobrenedant per decantació, rentar el precipitat amb 1 ml d'etanol 75% i centrifugar a 13.000 x g 10 minuts a TA.
- Eliminar completament el sobrenedant i deixar assecat totalment (incubar el tub obert a 55-65°C per afavorir l'evaporació dels residus d'etanol).
- Resuspendre el precipitat en 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8 i incubar 10 minuts a 55-65°C amb el tub tancat.
- Quantificar la concentració d'ADN obtingut (apartat 4.2.3) i guardar a -20°C fins a la seva utilització.

#### 4.2.1.5. Extracció d'ADN total mitjançant un *kit* comercial

Aquest mètode s'utilitza per a l'extracció d'ADN d'aquelles mostres on es vol determinar el número de còpies de l'ADNmt. S'utilitza el *kit* comercial *QIAmp® DNA Mini Kit (51306, QIAGEN)* per a l'obtenció d'ADN total (genòmic, mitocondrial i viral). Aquest mètode permet obtenir fragments d'ADN de fins a 50 kb. Es parteix d'aproximadament 20 mg de teixit polvoritzat (apartat 4.8.7) i per a l'obtenció de l'ADN es segueix el protocol descrit en el propi *kit*. Es quantifica la concentració d'ADN obtingut (apartat 4.2.3) i es guarda a -20°C fins a la seva utilització.

#### 4.2.2. EXTRACCIÓ D'ARN

##### 4.2.2.1. Extracció d'ARN mitjançant un *kit* comercial

Aquest mètode s'utilitza per a l'obtenció d'ARN de sediments cel·lulars. S'utilitza el *kit* comercial *RNeasy Mini Kit (74106, QIAGEN)*. Es parteix d'un sediment de com a mínim  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules i es segueix el protocol descrit en el *kit*. Un cop obtingut l'ARN es quantifica la seva concentració (apartat 4.2.3) i es guarda a -80°C fins a la seva utilització.

##### 4.2.2.2. Extracció d'ARN mitjançant el reactiu TRIzol

Aquest mètode s'utilitza per a l'obtenció d'ARN a partir d'una mostra de teixit de ratolí. S'utilitza el reactiu *TRIzol™ Reagent (15596026, ThermoFisher)* i es segueix el següent protocol:

- Homogeneïtzar 20 mg de teixit polvoritzat en 1 ml *TRIzol™ Reagent* (una solució monofàsica de fenol i isotiocianat de guanidina) utilitzant un homogeneïtzador mecànic acoblat a un morter de plàstic estèril per a dur a terme la lisis cel·lular. Incubar durant 5 minuts a TA per permetre la dissociació completa dels complexos de nucleoproteïnes.
- Afegir 200 µl de cloroform i incubar 2 minuts a TA.
- Centrifugar a 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C.
- Transferir la fase aquosa superior, que conté l'ARN, a un tub nou.
- Afegir 500 µl d'isopropanol i incubar 10 minuts en gel.
- Centrifugar a 12.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i rentar el precipitat amb 1 ml d'etanol 75%.

- Centrifugar a 7.500 x g durant 5 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i deixar assecar l'ARN durant 5-10 minuts.
- Dissoldre l'ARN en 30-50 µl d'aigua lliure de RNases.
- Es quantifica la concentració d'ARN obtingut (apartat 4.2.3) i es guarda a -80°C fins a la seva utilització.

#### 4.2.3. QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Independentment del procediment realitzat per a l'obtenció de l'ADN o l'ARN, es quantifica la concentració del material resultant amb l'aparell *NanoDrop® ND-1000* o *NanoDrop® ND-2000* (*NanoDrop Technologies*). Es carreguen 2 µl de mostra al pedestal inferior de l'aparell i es baixa el braç de mostreig. Es llegeix l'absorbància a 260 nm i es calcula la concentració a partir de la llei de Lambert-Beer:

$$c = (A \cdot \epsilon) / b$$

On la **c** és la concentració d'àcid nucleic en ng/µL; **A** és l'absorbància a 260 nm en AU; **ε** és el coeficient d'extinció molar en ng·cm/µl (en el cas de l'ADN en doble cadena 50 ng·cm/µL i en el cas de l'ARN 40 ng·cm/µL); i **b** és la longitud de la trajectòria de la llum a través de la mostra en cm.

##### 4.2.3.1. Anàlisi de la qualitat de l'ARN

Adicionalment, per l'ARN obtingut de teixit de ratolí, es determina la concentració i la qualitat de manera més exacta utilitzant *RNA 6000 nanochips* (*Agilent*) i es processa mitjançant el *Bionalyzer Automated Analysis System*. L'ARN es separa mitjançant una electroforesis capil·lar, s'identifiquen les molècules d'ARNr de 18s i 28s segons el pes molecular i es dona un índex d'integritat de la mostra en funció del ràtio d'aquestes dues espècies d'ARNr.

#### 4.2.4. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

La determinació de la concentració de proteïna en homogenats de les diferents mostres (tant de sediments cel·lulars com de teixits de ratolí) es realitza mitjançant una variant del mètode clàssic de Bradford [211]. En concret, es prepara una recta patró a partir d'una solució d'albumina bovina a una concentració de 2 mg/ml. A partir d'aquesta solució, es preparen una sèrie de dilucions a diferents concentracions (0,3;

0,2; 0,15; 0,1 i 0,05 mg/ml) en exactament el mateix tampó que conté la mostra, per obtenir la recta patró.

La determinació es fa en plaques de 96 pous i cada punt de la recta així com cada mostra es mesuren per triplicat. S'afegeixen 8 µl de mostra per pou i seguidament s'afegeix 200 µl del reactiu *Coomassie Protein Assay Reagent (23200, ThermoFisher)*. Es tracta d'una solució de blau de *Coomassie G-250*, metanol i àcid fosfòric que quan està en medi aquós té color marró i quan està en un ambient hidrofòbic (en l'interior d'una proteïna) és de color blau (la intensitat del color blau és directament proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra). Es mesclen bé la mostra i el reactiu i la mescla s'incuba 5 minuts a temperatura ambient i es determina l'absorbància a una longitud d'ona de 590 nm. Per calcular la concentració, s'interpolen els valors d'absorbància obtinguts per la mostra amb els valors de la recta patró.

#### **4.2.5. ELECTROFORESIS EN GELS D'AGAROSA**

L'electroforesi en gel d'agarosa s'utilitza per a la separació de fragments d'ADN provinents d'una PCR (apartat 4.8.2) o d'una reacció de restricció (apartat 4.9.3) per a comprovar que tenen la mida esperada. Es pesa la quantitat d'agarosa necessària, i es dissol amb tampó TBE (90 mM Tris-borat, 2 mM EDTA; pH 8), escalfant la solució al microones sense arribar a l'ebullició. Posteriorment s'afegeix bromur d'etidi a una concentració final 0,6 µg/ml.

Es carreguen les mostres amb una dilució 1/10 en el tampó de càrrega 10X (50mM Tris-HCl (pH 8), 20mM EDTA, 50% (v/v) Glicerol, 0,3% (p/v) *Orange G (08756 Sigma Aldrich)*). L'electroforesi es realitza en tampó TBE aplicant un voltatge constant de 100V durant el temps necessari per a la separació de les bandes. Es visualitzen les bandes sota una font de llum ultraviolada.

### **4.3. PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL (QPCR)**

#### **4.3.1. DETERMINACIÓ DE NÚMERO DE CÒPIES AMB SONDES TAQMAN™**

**Número de còpies del vector lentiviral en les cèl·lules transduïdes.** A partir de l'ADN extret per fenol-cloroform simplificat (apartat 4.2.1.4) s'avalua l'eficiència de

transducció de cadascun dels vectors lentivirals en les cèl·lules en cultiu, i es calcula el número de còpies integrades en el genoma. En tots els casos, la seqüència de l'ADNc de *TYMP* ha estat modificada cosa que impossibilita la utilització d'una mateixa sonda per els diferents vectors. Per aquesta raó, s'utilitza la seqüència de la proteïna verda fluorescent millorada (EGFP) com a diana de la sonda per a calcular el número de còpies, ja que aquest gen es troba en tots els vectors, i per cada còpia d'EGFP hi ha una còpia de *TYMP*. Com a gen de referència per normalitzar s'utilitza el gen de la RNAsa P. Les sondes utilitzades estan detallades a la **Taula 4.2**.

**Taula 4.2. Sondes Taqman™ MGB utilitzades per a la determinació del número de còpies del vector lentiviral en cèl·lules**

Gen	Referència sonda	Fluoròfor
<i>EGFP</i>	Mr04097229_mr <sup>1</sup>	FAM
<i>RNase P</i>	4316849 <sup>1</sup>	VIC

<sup>1</sup> ThermoFisher.

Com que les dues sondes tenen fluoròfors diferents, l'aparell és capaç de distingir-los per separat i es poden determinar a la vegada en el mateixa reacció (múltiplex).

Es prepara una corba estàndard a partir de dos plasmidis amb número de còpies d'*EGFP* i *RNaseP* coneguts i es realitzen dilucions seriades en 10mM Tris-HCl pH 8. La composició de la mescla de reacció està indicada a la **Taula 4.3**:

**Taula 4.3. Composició de la reacció d'amplificació per a determinar el número de còpies del vector lentiviral**

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
2X TaqMan R Universal PCR Master Mix with UNG <sup>1</sup>	5	1X
Sonda <i>EGFP</i> 20X	0,5	1X
Sonda <i>RNase P</i> 20X	0,5	1X
Aigua estèril	1,5	-
Mostra ADN (100 ng/µl o 20 ng/µl segons dilució)	2,5	25 – 5 ng/µl

<sup>1</sup> Referència: 4440045, ThermoFisher



**Número de còpies del vector adenoassociat en teixit de ratolí.** Amb l'ADN extret per fenol-cloroform (apartat 4.2.1.3) s'avalua l'eficiència de transducció de cadascun dels vectors adenoassociats en diferents teixits del ratolí, i es calcula el número de còpies de vector per cèl·lula. Es va utilitzar la seqüència de *TYMP* humana com a diana de la sonda ja que és comú en tots els vectors, com a gen de referència es va utilitzar el gen murí de l'angiogenina I (*Ang1*). Les sondes utilitzades estan detallades a la **Taula 4.4**.

**Taula 4.4. Sondes Taqman™ MGB utilitzades per a la determinació del número de còpies del rAAV per cèl·lula**

Gen	Referencia sonda	Fluoròfor
<i>TYMP</i>	Hs00157317_m1	FAM
<i>Ang1</i>	Mm00833184_s1	FAM

En aquest cas com que les sondes tenen el mateix fluoròfor, s'ha de preparar la reacció de cada sonda per separat. Com abans, es prepara una corba estàndard amb número de còpies coneguts de *TYMP* i *Ang1* a partir de dos plasmidis que contenen clonats cada gen respectivament. La composició de la mescla de reacció es troba a la **Taula 4.5**.

**Taula 4.5. Composició de la reacció d'amplificació per a determinar el número de còpies del rAAV**

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
2X TaqMan R Universal PCR Master Mix with UNG <sup>1</sup>	5	1X
Sonda de cada gen 20X	0,5	1X
Aigua estèril	1,5	-
Mostra ADN (100 ng/µl o 20 ng/µl segons dilució)	2,5	25 – 5 ng/µl

<sup>1</sup> Referència: 4440045, ThermoFisher

**Número de còpies d'ADNmt en teixit de ratolí.** Per a determinar si les mostres presenten depleció es calcula el número de còpies d'ADNmt a partir de l'ADN total extret amb el kit *QIAmp® DNA Mini Kit* (apartat 4.2.1.5). S'utilitzen uns encebadors i

una sonda que reconeixen una zona de la regió del 16s de l'ADNmt. En el cas de la regió 16s aquest cas s'utilitzen la sonda i els encebadors per separat:

- Sonda MGB: FAM-5' AAG TCC TAC GTG ATC TGA GGT 3'-MGB
- Encebador directe: AAT GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT
- Encebador revers: AGA AAC CGA CCT GGA TTG CTC

Com a gen de referència nuclear s'utilitza *Ang1* (Mm00833184\_s1 amb el fluoròfor FAM).

Les dues sondes tenen el fluoròfor FAM, per tant la reacció per a cada sonda haurà de ser per separat. També com en els altres casos, com a corba estàndard s'utilitzen dos plasmidis diferents que tenen clonades aquestes 2 regions amb un número de còpies conegut. Les dilucions es realitzen amb 10 mM Tris-HCl pH 8.

La composició de la mescla de reacció per la sonda *Ang1* coincideix amb la de la **Taula 4.5** i per la sonda 16s està detallada a la **Taula 4.6**.

**Taula 4.6. Composició de la reacció d'amplificació per a determinar el número de còpies d'ADNmt**

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
2X TaqMan R Universal PCR Master Mix with UNG <sup>1</sup>	5	1X
Sonda 16s 5 µM	0,3	150 nM
Encebador 16s Directe 10µM	0,3	300 nM
Encebador 16s Revers 10 µM	0,3	300 nM
Aigua estèril	1,6	-
Mostra ADN (50 ng/µl o 12,5 ng/µl segons dilució)	2,5	12,5 – 2,5 ng/µl

<sup>1</sup> Referència: 4440045, ThermoFisher

Les reaccions es realitzen en plaques de 384 pous utilitzant la plataforma *ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Els punts de la corba estàndard es carreguen per triplicat, i de cada mostra es carreguen dos duplicats de dues dilucions diferents (100 ng/µl i 20 ng/µl; dilucions en Tris-HCl 10mM pH 8), de manera que cada mostra s'analitza per quadruplicat. Les condicions d'amplificació estan detallades a la **Taula 4.7**.

**Taula 4.7. Condicions de l'amplificació per qPCR**

Temperatura	Temps	Cicles
50°C	2 minuts	1
95 °C	10 segons	
95°C	15 segons	40
60°C	1 minut	

Els resultats s'analitzen amb el programa *SDS 2.4.1 (Applied Biosystems)*. Per determinar el número de còpies, s'interpola el valor de *Ct* (punt on la fluorescència supera el llindar) obtingut per a cada mostra a la recta estàndard per a obtenir un valor de número de còpies. El número de còpies del vector per cèl·lula s'obté de la següent manera:

$$\frac{\text{Còpies gen d'interés}}{\text{Còpies gen de referència}} \cdot 2$$

Com que els dos gens de referència (*RnaseP* i *Angl*) són diploides, per a obtenir el número de còpies del vector per cèl·lula, el resultat de la divisió entre les còpies del gen d'interès i el gen de referència s'ha de multiplicar per 2.

### 4.3.2. ESTUDIS D'EXPRESSIÓ GÈNICA

Es parteix de l'ARN extret amb diversos mètodes (apartats 4.2.2.1 i 4.2.2.2) i es realitza un tractament amb DNasa utilitzant el *kit* comercial *DNA-free™ DNA Removal (AM1906, ThermoFisher)* per eliminar la possible contaminació de la mostra amb ADN. Es prepara la mescla de reacció (**Taula 4.8**).

**Taula 4.8. Composició de la mescla de reacció per al tractament amb DNasa**

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
<i>DNase I</i> buffer 10X <sup>1</sup>	5	1x
<i>DNase I</i> (2U/µl)	1	0,04 U/µl
Mostra d'ARN	Fins a 10 µg d'ARN	-
Aigua lliure d'ARNases	Fins a 50 µl	-

<sup>1</sup> 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>

S'incuba la mescla 30 minuts a 37°C i a continuació s'afegeixen 5 µl de *DNase Inactivation Reagent*. Es barreja bé i s'incuba la mescla 2 minuts a TA. Es centrifuga

a 10.000 xg durant 1,5 minuts. Finalment es recupera el sobrenedant on hi ha l'ARN i es transfereix a un tub nou.

A partir de la mostra d'ARN tractada amb DNAsa, es procedeix a l'obtenció de l'ADNc mitjançant retrotranscripció amb el *kit* comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (4368814, ThermoFisher). La composició de la mescla de reacció es troba a la **Taula 4.9**.

**Taula 4.9. Composició de la mescla de reacció per a la retrotranscripció**

Reactiu	Volum ( $\mu$ l)	Concentració final
RT Buffer 10X	2	1X
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (2U/ $\mu$ l)	1	0,2 U/ $\mu$ l
Mix de dNTPs (100 mM)	0,8	8 mM
RT Random Primers	2	
Aigua lliure d'ARNases	4,2	-
ARN tractat amb DNAsa	10	Màxim 2 $\mu$ g d'ARN

La mescla s'incuba 10 minuts a 25°C, 2 hores a 37°C i finalment 5 minuts a 85°C per obtenir l'ADNc que s'utilitza per determinar la quantitat relativa de la transcripció de gens d'interès respecte la transcripció d'un gen utilitzat com a control endogen (en tots els casos el gen de la ciclofilina A (tan el gen humà *PPIA*, com el murí *Ppia*)). S'utilitzen les sondes *Taqman* predissenyades que s'indiquen a la **Taula 4.10**.

La composició de la mescla de reacció (**Taula 4.5**), les condicions de reacció (**Taula 4.7**) i la plataforma coincideixen amb les descrites en l'apartat 4.3.1. Les mostres s'analitzen per quadruplicat (dues rèpliques de dues dilucions) i s'inclou una mostra control del tractament amb DNAsa (mostra no retrotranscrita) que no ha d'amplificar.

En aquest cas, al ser una quantificació relativa, no s'inclou una recta patró sinó que els resultats es mostren relatius a una mostra calibradora. L'anàlisi del resultat es realitza amb el programa *RQ Manager 1.2.2*.

**Taula 4.10. Sondes Taqman™ MGB utilitzades en els estudis d'expressió gènica**

Gen	Referència sonda	Fluoròfor	Gen control endogen	Referència sonda	Fluoròfor
<b>Quantificació relativa de la transcripció dels vectors lentivirals en cèl·lules</b>					
<i>EGFP</i>	Mr04097229_mr	FAM	PPIA	Hs999999904_m1	FAM
<b>Quantificació relativa de la transcripció dels vectors adenoassociats en teixits de ratolí</b>					
<i>TYMP</i>	Hs00157317_m1	FAM	Ppia	Mm02342430_g1	FAM
<b>Quantificació relativa de la transcripció d'altres gens en teixits de ratolí</b>					
<i>Tymp</i>	Mm01301808_m1	FAM	Ppia	Mm02342430_g1	FAM
<i>Upp1</i>	Mm00447676_m1	FAM			
<i>Upp2</i>	Mm01331071_m1	FAM			

## 4.4. PROVES BIOQUÍMIQUES

### 4.4.1. DETERMINACIÓ DELS NUCLEÒSIDS dThd I dUrd

#### 4.4.1.1. Determinació de dThd i dUrd en plasma de ratolins

S'obté el plasma tal i com està descrit a l'apartat 4.8.4. Abans de procedir a la determinació dels nucleòsids, s'han de desproteïnitzar les mostres. El protocol és el següent:

- Es fan dues alíquotes de 200 µl de plasma diluït en PBS, i en una de les alíquotes s'afegeixen 3 µl de TP recombinant d'*E. coli* (≥ 500 unitats/ml) purificada (*T2807*, *Sigma*) per obtenir el blanc.
- S'incuben les dues alíquotes a 37°C durant 30 minuts.
- S'afegeixen 9 µl de 11,7 M HClO<sub>4</sub> per a desnaturalitzar les proteïnes presents.
- Es centrifuga a 20 000 x g durant 10 minuts a 4°C i es recull el sobrenedant desproteïnitzat.

S'analitza el sobrenedant obtingut per cromatografia líquida d'alta pressió (UPLC) on es detecten els compostos per espectrofotometria ultraviolada.

S'injecten 5 µl de sobrenedant en l'aparell de cromatografia *Acquity UPLC* (*Waters Corporation*). Els compostos presents en la mostra es separen per hidrofobicitat a través d'una columna C18 *Acquity UPLC BEH*, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm de mida de partícula i 130 Å de mida de porus (*Waters Corporation*). La fase mòbil consisteix en una solució aquosa (acetat d'amoni 20 mM pH 5,6) com a eluent B i una solució orgànica (metanol) com a eluent A. La mostra s'elueix sota un flux de 0,5 ml/min amb el següent gradient:

- De 0 a 1,1 minuts: 100% d'eluent B.
- De 1,1 a 5 minuts: Gradient constant de 100% a 86,4% d'eluent B.
- De 5 a 5,1 minuts: Gradient constant de 86,4% a 0% d'eluent B.
- De 5,1 a 6,1 minuts: 100% d'eluent A.
- De 6,1 a 7,2 minuts: 100% d'eluent B.

Durant tot el procés es monitoritza l'absorbància de l'eluït a 267 nm. La identificació dels pics corresponents a dThd i dUrd es realitza en base el temps de retenció. El càlcul de la concentració de cada compost es fa mitjançant la integració de l'àrea del seu pic i la interpolació amb les àrees dels pics d'una recta estàndard de concentracions conegudes de cada compost (entre 0,05 µM i 100 µM). Finalment, a la concentració obtinguda a cada mostra, se li resta la concentració del seu blanc i el resultat es multiplica pel factor de dilució.

#### **4.4.1.2. Determinació de dThd i dUrd en teixits de ratolí**

En aquest cas la determinació es realitza per cromatografia líquida d'alta pressió (UPLC) acoblada a una detecció per espectrometria de masses amb l'aparell *Acquity UPLC-MS/MS* (*Acquity UPLC-Xevo TQ Mass Spectrometer, Waters, Milford, MA, USA*). Abans de poder determinar els nucleòsids, les mostres s'han d'homogeneïtzar i desproteïnitjar.

#### **Preparació de les mostres de teixit**

S'homogeneïtzen 100-200 mg de teixit polvoritzat (apartat 4.8.7) amb un morter de plàstic i amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic, en 500 µl de tampó de lisi (TL) (1% (v/v) Triton X-100; 2 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF); 0,02% (v/v) de 2-mercaptoetanol; 50 mM Tris-HCl pH 7,2) amb l'addició de 1 µM d'un estàndard

intern (timidina marcada amb isòtops no radiactius ( $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_2\text{-dThd}$ ) (dThd\*)). Addicionalment, a les mostres de fetge i intestí prim, s'afegeixen inhibidors de l'activitat TP per prevenir la degradació *in vitro* dels nucleòsids durant la homogeneïtzació de les mostres degut a l'elevada activitat TP que presenten aquests teixits. Per a les mostres de fetge, s'hi afegeix 100  $\mu\text{M}$  de 5-cloro-6-[1-(2-iminopirrolidinil)metil] uracil (TPI), un inhibidor específic de la TP humana [212]. Per a les mostres d'intestí prim s'afegeix 100  $\mu\text{M}$  de 6-amino-5-bromouracil (inhibidor de TP i UP) i 100  $\mu\text{M}$  tetrahidouridina (inhibidor de la citidina deaminasa).

Els homogenats es centrifuguen a 20.000 x g durant 30 minuts a 4°C i es mesura la concentració de proteïna del sobrenedant (apartat 4.2.4). A continuació, es desproteïnitzen les mostres per ultrafiltració amb filtres de 10 kDa (*10 kDa Amicon Ultra filters; Merck Millipore, Billerica, MA, USA*). S'afegeix la mostra al filtre i es centrifuga a 14000 x g durant 30 minuts a 4°C per obtenir el filtrat sense proteïnes.

#### Determinació dels nucleòsids per espectrometria de masses

S'injecten 5  $\mu\text{l}$  de sobrenedant en l'aparell de cromatografia *Acquity UPLC-MS/MS* (Waters Corporation). Els compostos presents en la mostra es separen per hidrofobicitat a través d'una columna C18 *Acquity UPLC BEH*, 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  de mida de partícula i 130 Å de mida de porus (*Waters Corporation*). La fase mòbil consisteix en una solució aquosa (acetat d'amoni 20 mM pH 5,6) com a eluent B i una solució orgànica (acetonitril) com a eluent A. La mostra s'elueix sota un flux de 0,5 ml/min amb el següent gradient:

- De 0 a 1,1 minuts: 100% d'eluent B.
- De 1,1 a 5 minuts: Gradient constant de 100% a 86,4% d'eluent B.
- De 5 a 5,1 minuts: Gradient constant de 86,4% a 0% d'eluent B.
- De 5,1 a 6,1 minuts: 100% d'eluent A.
- De 6,1 a 7,2 minuts: 100% d'eluent B.

La identificació dels compostos es fa per espectrometria de masses mitjançant ionització amb electroesprai positiu per la dThd, la dUrd i la dThd\* amb les següents transicions:

- dThd: 242,8  $\rightarrow$  127,1 (voltatge de con 10 V i energia de col·lisió 12 eV).

- dThd\*: 255,0 → 133,8 (voltatge de con 10 V i energia de col·lisió 12 eV).
- dUrd: 228,8 → 113,1 (voltatge de con 8 V i energia de col·lisió 12 eV).

En paral·lel, també es monitoritza l'absorbància de l'eluit a 267 nm.

La quantificació de la concentració de cada compost es basa en la integració de l'àrea del pic i la interpolació amb les àrees dels pics d'una recta estàndard de concentracions conegudes d'aquests desoxinucleòsids (entre 0,05  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ ) utilitzant el *software TargetLynx (Waters Corporation)*. Els resultats s'expressen en picomols/mg de proteïna, multiplicant la concentració obtinguda (corregida per la concentració de l'estàndard intern) per la concentració del homogenat.

#### 4.4.2. DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT TIMIDINA FOSFORILASA

S'utilitza el mètode descrit prèviament [213]. Es treballa en tot moment mantenint les mostres en gel. El protocol consisteix en una homogeneïtzació que varia en funció de si es tracta d'una mostra que prové de teixits de ratolí o de sediments cel·lulars.

En el cas de les mostres provinents de teixit, s'homogeneïtzen aproximadament 50 mg de teixit congelat i polvoritzat en 400  $\mu\text{L}$  de TL (1% (v/v) Tritó X-100; 2 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF); 0,02% (v/v) de 2-mercaptoetanol; 50 mM Tris-HCl pH 7,2) utilitzant un homogeneïtzador mecànic i un morter de plàstic. Mentre que en el cas dels sediments cel·lulars (com a mínim es parteix de 1 milió de cèl·lules) s'homogeneïtzen en 200  $\mu\text{L}$  de TL passant la suspensió unes 10 vegades a través d'una agulla de 30G.

Els homogenats es centrifuguen a 20.000  $\times$  g durant 30 minuts a 4°C i es recupera el sobrenedant. Es determina la concentració de proteïna del sobrenedant (apartat 4.2.4).

Les mostres es dilueixen a una concentració de 1,35 mg/ml (en el cas dels homogenats provinents de teixit) o 0,135 mg/ml (en el cas dels homogenats provinents de sediments cel·lulars) en TL i es prepara la mescla de reacció (**Taula 4.11**).



**Taula 4.11. Composició de la mescla de reacció per a la determinació de l'activitat TP**

Reactiu	Reacció de determinació	Reacció del blanc
Tampó de reacció (0,1M Tris-arsenat, pH 6,5)	20 µl	20 µl
Homogenat <sup>1</sup>	74 µl	74 µl
dThd (166,7 mM)	6 µl	-
Volum final	100 µl	94 µl

<sup>1</sup> Concentració en funció de l'origen de l'homogenat. 1,35 mg/ml per homogenats provinents de teixits de ratolí, i 0,135 mg/ml per a homogenats provinents de sediments cel·lulars.

La reacció de la determinació i del blanc s'incuben durant 1 hora a 37°C. Durant la incubació, la dThd afegida es transforma a timina degut a l'activitat TP de les mostres. S'afegeix 1 ml de HClO<sub>4</sub> 0,55M per a parar la reacció tant en el blanc com en la determinació. A continuació s'afegeixen els 6 µl de dThd 166,7 mM a la blanc de reacció, es centrifuguen les mostres a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C i es procedeix a la determinació de la concentració de timina per UPLC i detecció UV a 267nm com està descrit a l'apartat 4.4.1.1.

La identificació del pic de timina es realitza en base el temps de retenció. La concentració de timina es calcula mitjançant la integració de l'àrea del seu pic i la interpolació amb les àrees dels pics d'una recta estàndard de concentracions conegudes de cada compost (entre 0,05 µM i 100 µM). Finalment, a la concentració obtinguda se li resta la concentració del seu blanc. L'activitat enzimàtica s'expressa en nanomols de timina formats per hora i mg de proteïna i es calcula segons la següent fórmula:

$$Activitat TP \left( \frac{nmols Thy}{h \cdot mg prot} \right) = \frac{C_{Thy} \cdot V_f}{t \cdot (C_{prot} \cdot V_{hom})}$$

On **C<sub>Thy</sub>** és la concentració de timina (µM) en la mostra analitzada menys la concentració de timina del blanc; **V<sub>f</sub>** és el volum final de la mostra analitzada en ml (1,1 ml); **t** és el temps d'incubació en hores (1 h); **C<sub>prot</sub>** és la concentració de proteïna del homogenat; i **V<sub>hom</sub>** és el volum d'homogenat en la reacció (0,074 ml).

### 4.4.3. DETERMINACIÓ DE dNTPS MITOCONDRIALS

#### 4.4.3.1. Extracció de dNTPs mitocondrials

El protocol consisteix en primer lloc en l'enriquiment dels mitocondris per centrifugació diferencial i a continuació l'extracció dels dNTPs mitocondrials. Com que es vol preservar la integritat mitocondrial i la integritat dels dNTPs fins al moment de l'extracció dels dNTPs, es treballa a 4°C (cambra freda).

#### Purificació de mitocondris per centrifugació diferencial

Per a l'extracció mitocondrial a partir de **fetge** es segueix el següent protocol:

- Un cop extret el teixit fresc submergir-lo en 20 ml de tampó A (10mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8; 320 mM sacarosa) i tallar-lo en trossos petits amb l'ajuda d'unes tisores.
- Decantar el tampó A i repetir el tot el procés fins a un total de 3 vegades.
- Afegir 5 ml de tampó A, homogeneïtzar el teixit en homogeneïtzador de vidre fins que no quedin trossos visibles i traspasar-ho a un tub de 15 ml. Rentar l'homogeneïtzador amb 2 ml més de tampó A i afegir-los a la resta d'homogenat.
- Centrifugar a 1.000 x g durant 10 minuts a 4°C per sedimentar els nuclis.
- Recuperar el sobrenedant amb una pipeta, traspasar-lo a un tub de centrifuga i centrifugar-lo a 9.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant per decantació, i resuspendre el precipitat en 8 ml de tampó A.
- Distribuir els 8 ml en 8 tubs tipus *ependorf* (1 ml per tub) i centrifugar a 13.000 x g durant 2 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant, tornar a rentar els sediments amb 0,5 ml de tampó A cadascun, i distribuir en 4 tubs tipus *ependorf* (1 ml per tub). Centrifugar a 13.000 x g durant 2 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant, tornar a rentar els sediments amb 0,5 ml de tampó A cadascun, i distribuir en 2 tubs tipus *ependorf* (1 ml per tub). Centrifugar a 13.000 x g durant 2 minuts a 4°C.

- Eliminar el sobrenedant, tornar a rentar els sediments amb 0,5 ml de tampó A cadascun, i barrejar en 1 tub tipus *ependorf*. Centrifugar a 13000 x g durant 2 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i rentar el precipitat en 1 ml de tampó MAITE (25 mM sacarosa, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). Centrifugar a 13.000 x g durant 2 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 1 ml de tampó MAITE. Quantificar la concentració de proteïna (apartat 4.2.4). Durant la quantificació de proteïna es manté la suspensió de mitocondris en agitació en una sèria a 4°C.

En el cas del **cervell**, el protocol és el mateix excepte en pocs punts:

- El tampó d'homogeneïtzació del cervell és el tampó AT (Tris-HCl 10mM pH 7,4; EGTA 1 mM pH 8; sacarosa 75 mM; sorbitol 225 mM i 0,1% (p/v) BSA (sense àcids grassos).
- Decantar el tampó AT.
- Afegir 5 ml de tampó AT nou i homogeneïtzar el teixit en un homogeneïtzador de vidre fins que no quedin trossos visibles i traspasar-ho a un tub de 15 ml. Rentar l'homogeneïtzador amb 2 ml més de tampó AT i afegir-los a la resta d'homogenat.
- Centrifugar a 1.000 x g durant 10 minuts a 4°C per sedimentar els nuclis.
- Recuperar el sobrenedant amb una pipeta, traspasar-lo a un tub de centrifuga. Tornar a homogeneïtzar el precipitat amb 5 ml de tampó AT, i repetir el pas anterior.
- Tornar a recuperar el sobrenedant i afegir-lo al anteriorment obtingut. Centrifugar a 9.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
- En els rentats del sediment de mitocondris, en lloc de partir de 8 ml i 8 tubs, partir de 4 ml i 4 tubs.
- Després del rentat amb el tampó MAITE, resuspendre en 500 µl de tampó MAITE. Quantificar la concentració de proteïna (apartat 4.2.4). Durant la quantificació de proteïna es manté la suspensió de mitocondris en agitació en una sèria a 4°C.

### Extracció de dNTPs mitocondrials a partir de la suspensió de mitocondris

Un cop obtinguda una suspensió de mitocondris es procedeix a l'extracció dels dNTPs. El protocol consisteix primer en una lisi àcida dels mitocondris, una extracció i una concentració. El protocol és el següent:

- Preparar alíquotes de 0,5 mg de proteïna (en tubs amb tap de rosca). Pel fetge si es pot preparar 4 alíquotes i pel cervell 1 alíquota i en alguns casos 2.
- Centrifugar a 13.000 x g durant 1 minut a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i afegir 300 µl de àcid tricloroacètic (TCA) 0,5M al precipitat. Resuspendre i mesclar amb el vòrtex durant 15 segons.
- Centrifugar a 20.000 x g durant 5 minuts a 4°C. Recuperar el sobrenedant.
- Afegir 450 µl de tri-n-octilamina 0,5M diluït en freó (1,1,2-triclorofluoroetà). Mesclar en vòrtex durant 30 segons.
- Centrifugar a 10.000 x g durant 10 minuts a 4°C. Recuperar 150µl de la fase aquosa superior.
- Assecar les mostres amb un concentrador de buit *SpeedVac* fins que estigui completament sec (3 hores sense fixar la temperatura). Emmagatzemar a -80°C fins a la determinació enzimàtica de dNTPs.

#### 4.4.3.2. Determinació enzimàtica de dNTPs

Per a la determinació dels nivells de dNTPs en els extractes s'utilitza un mètode de determinació enzimàtica basat en una reacció d'extensió catalitzada per una polimerasa [63]. Es determina cada nucleòtid (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) en reaccions independents. Hi ha diversos elements necessaris per a dur a terme la determinació.

#### Oligonucleòtids

S'utilitzen petits polímers sintetitzats que es formen a partir de la hibridació de dues cadenes de nucleòtids, una cadena curta comú que funciona com a encebador i una cadena llarga específica que serveix com a motlle per cadascun dels dNTPs que es volen mesurar (**Taula 4.12**). La cadena llarga conté el nucleòtid complementari al que es vol mesurar espaiat amb 2 o 3 nucleòtids de T o A.

**Taula 4.12. Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per a la determinació de dNTPs**

dNTP a determinar	Seqüència de l'oligonucleòtid
dATP	5' AAATAAATAAATAAATAAATGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dTTP	5' TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dGTP	5' TTTGTTTGTGGTTTGTGGTTTGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dCTP	5' TTTGTTTGTGGTTTGTGGTTTGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'

Cadascuna de les seqüències s'encarreguen per separat i es resuspenen els productes liofilitzats en 0,1M NaCl a una concentració final de 100 µM. Per a la hibridació, es prepara una solució equimolar de cadascuna de les combinacions i s'introdueix el tub en una mescla en aigua a 70°C. Es deixa que la temperatura baixi fins a temperatura ambient i d'aquesta manera s'obtenen els oligonucleòtids hibridats a una concentració de 50 µM. Finalment es dilueix en aigua fins a 5 µM i es guarden congelades les alíquotes a -20C fins al seu ús.

### dNTP radioactiu

En funció del nucleòtid que es mesura s'utilitza un radionucleòtid diferent. En el cas de la determinació dels nucleòtids dCTP, dGTP i dTTP, el radionucleòtid dATP-<sup>3</sup>H. En el cas de la determinació del dATP, el radionucleòtid que s'utilitza és el dTTP-<sup>3</sup>H.

Els radionucleòtids venen dissolts en etanol 50% i tenen una activitat específica inicial de 15-35 Ci/mmol. Per dur a terme la reacció s'ha d'eliminar l'etanol. Per aquesta raó es transfereix a un tub de 1,5 ml el volum necessari de radia nucleòtid (segons el número de mostres). Es calcula el volum necessari de la següent manera:

$$V_{stock} = \frac{V \cdot C}{C_{stock}}$$

On **V** és el volum necessari per a dur a terme la reacció (0,5 µl/ mostra); **C** és a la concentració a la té lloc la reacció (15 µM); i **C<sub>stock</sub>** la concentració a la que arriba el radionucleòtid, depèn de cada lot de radionucleòtid.

S'evapora l'etanol al *SpeedVac* fins està completament sec (20-30 minuts) i es resuspèn el radionucleòtid en aigua a una concentració final de 15  $\mu\text{M}$ . Aquesta preparació es realitza el mateix dia de l'assaig.

### Determinació

Es prepara una recta patró a partir de dilucions seriades d'una mescla que conté els 4 dNTPs a una concentració coneguda. Les dilucions es realitzen en 40 mM Tris-HCl pH 7,4. Les concentracions de les rectes són les següents:

- dATP, dCTP, dGTP: 400 nM, 200 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM i 5 nM.
- dTTP: 100 nM, 70 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM y 5 nM.

Els extractes de dNTPs mitocondrials (apartat 4.4.3.1) es resuspenen en 50  $\mu\text{l}$  de 40mM Tris-HCl pH 7,4 per obtenir mostres a una concentració de 12,5 ng/ $\mu\text{l}$  de proteïna (tot i que cal destacar que la mostra no té proteïnes ja que s'eliminen per la precipitació amb TCA) i es fan dilucions 1/3, 1/6 i 1/10 en el mateix tampó. Per a la determinació de cada nucleòtid s'utilitzaran dilucions diferents:

- **dATP:** mostra reconstituïda i dilució 1/3.
- **dTTP:** dilucions 1/3 i 1/10.
- **dCTP i dGTP:** dilucions 1/3 i 1/6.

En la determinació es mesura cadascuna de les dilucions per duplicat (cada mostra estarà mesurada per quadruplicat), i els punts de la recta patró per triplicat. Per a cada reacció s'afegeixen 5  $\mu\text{l}$  de mostra i 5  $\mu\text{l}$  de la mescla de reacció **Taula 4.13**.

**Taula 4.13. Composició de la reacció de determinació de dNTPs**

Reactiu	Volum ( $\mu\text{l}$ )	Concentració final
Tris-HCl 1M pH 7,4	0,2	20 mM
MgCl <sub>2</sub> 0,1M	1	10 mM
DTT 0,5M	0,1	5 mM
Oligonucleòtid corresponen 5 $\mu\text{M}$	0,5	0,25 $\mu\text{M}$
Nucleòtid radioactiu 15 $\mu\text{M}$	0,5	0,75 $\mu\text{M}$
<i>Sequencing Taq DNA Polymerase (Bioron)</i>	0,04	0,025 U/ $\mu\text{l}$
Aigua	2,66	-

La reacció es realitza a 48°C durant 1 hora. Després d'aquest temps, es fa un *spin* de centrifuga, es carreguen 9 µl del volum de reacció en 1 posició d'un filtre de fibra de vidre DEAE de 96 posicions (1450-522, *Perkin Elmer*) i es deixa assecat al aire. A continuació es realitzen una sèrie de rentats per eliminar el radionucleòtid no incorporat, sempre mantenint el filtre en agitació constant i a temperatura ambient. Es realitzen 3 rentats de 10 minuts i 3 de 5 minuts amb 5% (p/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 rentat de 10 minuts amb aigua miliQ i 1 rentat de 10 minuts amb etanol 70% (v/v). Finalment es deixa assecat el filtre.

El filtre es cobreix amb una placa de reactiu de centelleig sòlid (*MultiLex A*, 1450-441 *Perkin Elmer*) que s'hi fon a sobre en un forn a 80°C. Es deixa assecat a temperatura ambient i es mesura la radioactivitat retinguda (en cpm) amb un comptador d'emissions β (*MicroBeta2 Microplate counter* (*PerkinElmer*)). La quantitat de dNTPs mitocondrial es calcula interpolant els cpm obtinguts a cada mostra amb els cpm de la recta estàndard i corregint per els factors de dilució corresponents.

## 4.5. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES PER WESTERN-BLOT

### 4.5.1. OBTENCIÓ D'EXTRACTES PROTEICS

S'homogeneïtzen 50 mg de teixit polvoritzat en 200 µl de tampó RIPA (50 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% SDS (p/v); 0,5% (p/v) desoxicolat de sodi; IGEPAL® CA-630 (Sigma Aldrich) 1% (v/v); còctel inhibidor de proteases 1X (*cComplete™*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, *Sigma Aldrich*, 11873580001) amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic i un morter de plàstic. Es centrifuguen les mostres a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant i es mesura la concentració de proteïna (apartat 4.2.4).

Es porten totes les mostres a una concentració de 1 mg/ml diluint-les amb tampó RIPA i s'emmagatzemen alíquotes de 10 µl a -80°C fins al seu ús.

### 4.5.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS I TRANSFERÈNCIA

Es prepara un gel de poliacrilamida-SDS de 1,5 mm de gruix utilitzant el sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell* (*Bio-Rad*). El gel es compon de dues parts, un gel separador

al 10% de poliacrilamida i un gel concentrador al 5%. En primer lloc es prepara el gel separador (**Taula 4.14**):

**Taula 4.14. Composició del gel separador**

Reactiu	Volum
Aigua miliQ	4,75 ml
Poliacrilamida 40% (p/v)	2,5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,55 ml
SDS 10% (p/v)	100 µl
Persulfat d'amoni (APS) 10 % (p/v)	100 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina)	4 µl

S'afegeixen uns 7 ml al gel per a que polimeritzi, i s'afegeix aigua miliQ a sobre, i es deixa fins que estigui polimeritzat. S'elimina l'aigua per decantació i s'afegeix el gel concentrador (**Taula 4.15**).

**Taula 4.15. Composició del gel concentrador**

Reactiu	Volum
Aigua miliQ	2,22 ml
Poliacrilamida 40% (p/v)	375 µl
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	380 µl
SDS 10% (p/v)	30 µl
Persulfat d'amoni (APS) 10 % (p/v)	30 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina)	3 µl

S'afegeixen 2 ml de la mescla a sobre del gel revelador, s'afegeix la tinta evitant que es formin bombolles i es deixa polimeritzar.

Es descongelen les mostres i s'afegeixen 10 µl de tampó de càrrega 2X (100 mM Tris-HCl pH 6.8; 4% (p/v) SDS; 20% (v/v) glicerol; 200 mM DTT; 0,1% (p/v) blau de bromofenol). S'incuben les mostres a 95°C durant 5 minuts.

Es carreguen 15 µl per pou (15 µg de proteïna), i es reserva un carril per carregar 10 µl del marcador de pes molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (Bio-Rad)).



L'electroforesi es realitza en el tampó d'electroforesi (192 mM de Glicina; 0,1% (p/v) SDS i 25 mM Tris pH 8,3) i s'aplica una corrent elèctrica constant de 80V els primers 30 minuts i de 120V la resta del temps, fins que desapareix el front d'electroforesi.

Un cop ha acabat l'electroforesi es procedeix a la transferència de les proteïnes des del gel a una membrana de PVDF (polifluorur de vinilidè) de 6x9 cm. La membrana de PVDF s'activa submergint-la en metanol durant 1 minut i deixant-la un mínim de 30 minuts en tampó de transferència (48 mM Tris; 39 mM de Glicina; 0,04% p/v SDS; 20% (v/v) metanol) fred.

Per a la transferència s'utilitza un sistema de transferència humida, en primer lloc es col·loquen 3 filtres *Whatman* de 6x9 cm mullats en tampó de transferència; a continuació el gel, després la membrana i a finalment 3 filtres *Whatman* més. Finalment, es col·loca una esponja a cada banda i es munta en el casset de transferència. Es col·loca el casset en una cubeta d'electroforesis de manera que el gel quedi connectat al pol negatiu ja que les proteïnes és desplaçaran del gel a la membrana des del pol negatiu al pol positiu. Es cobreix tot amb tampó de transferència i s'aplica una corrent elèctrica a una intensitat constant de 400 mA durant 1 hora a 4°C.

#### 4.5.3. IMMUNODETECCIÓ I REVELAT

Es recull la membrana i s'incuba 1 hora en 20 ml de llet en pols al 5% (p/v) en TTBS (150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20; 20 mM Tris-HCl pH 7,6) a TA i en agitació constant.

A continuació, s'incuba la membrana amb l'anticòs primari específic de la proteïna que es vol detectar. L'anticòs primari es dissol (**Taula 4.16**) en llet en pols al 5% (p/v) en TTBS i s'incuba ON a 4°C. Cada membrana també s'incuba amb un anticòs primari sobre la proteïna control ( $\alpha$ -tubulina) preparat de la mateixa manera.

*Taula 4.16. Anticossos primaris utilitzats*

Proteïna	Referència	Clonalitat	Dilució
UP1	ab128854	Monoclonal	1/5000
$\alpha$ -tubulina	ab184613	Monoclonal	1/5000

A continuació es realitza un cicle de rentats amb TTBS que consisteix en 2 rentats de 10 minuts i 2 rentats de 5 minuts en agitació constant a TA.

Posteriorment, s'incuba la membrana amb un anticòs secundari que reconeix les IgGs de ratolí (*P0260, Agilent*) o de conill (*P0448, Agilent*) en funció del hoste on s'ha generat l'anticòs primari. Aquest anticòs està conjugat amb la peroxidasa de rave que permetrà la seva detecció per quimioluminescència. L'anticòs secundari es dissol en llet en pols al 5% en TTBS 1:7.500 vegades i s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació constant. Novament, es fa un cicle de rentats abans del revelat.

Pel revelat, s'incuba la membrana amb 1,5 ml d'una mescla 1:1 recent preparada dels dos reactius del *kit Immobilon™ Western (WBKLS0500, Millipore)*. Es capten les imatges mitjançant el detector de quimioluminescència *ODYSSEY Fc (Li-COR)* amb una exposició de 2 minuts. Finalment es quantifiquen les bandes mitjançant un anàlisi densitomètric amb el propi software de l'aparell (*Image Studio Lite v5.2*).

## 4.6. CULTIUS CEL·LULARS

### 4.6.1. CONDICIONS GENERALS DE CULTIU I MANTENIMENT DE LÍNIES CEL·LULARS

Totes les línies cel·lulars es cultiven a un incubador humidificat a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Les línies cel·lulars que creixen en adherència (HEK293T i Huh7) es cultiven en flascons o plaques de cultiu tractades de manera que la superfície és més hidrofílica i afavoreix la unió cel·lular, i les que creixen en suspensió (LCLs) en flascons o plaques no tractades.

#### Criopreservació de línies cel·lulars

La composició del medi de congelació és en un 90% sèrum fetal boví (FBS) i un 10% de dimetilsulfòxid (DMSO). Es fan alíquotes de 5·10<sup>6</sup> cèl·lules/ml en tubs adequats per la criopreservació. En primer lloc es congelen a -80°C en un recipient amb isopropanol que permet una congelació gradual, i un cop transcorregudes 24h es passen els vials a un tanc de nitrogen líquid a -170°C.

La descongelació s'ha de fer de manera ràpida per evitar la toxicitat del DMSO. Es descongela el vial a 37°C, un cop descongelat, es dilueix el DMSO en medi de cultiu i es centrifuga a 400 x g durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en el medi de cultiu. Finalment es sembren les cèl·lules en el recipient on es vulguin cultivar.

#### 4.6.2. LÍNIES CEL·LULARS I MEDIS

**HEK293T** (*Human Embryonic Kidney 293T*). La línia cel·lular HEK293T creix en adherència en medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) High Glucose (*L0102, Biowest*) suplementat amb els següents components (**Taula 4.17**):

*Taula 4.17. Composició del medi de cultiu de la línia cel·lular HEK293T*

Reactiu	Concentració inicial	Concentració final	Volum <sup>1</sup>
FBS <sup>2</sup>	-	10%	57,5 ml
L-Glutamina <sup>3</sup>	200 mM	2 mM	5,8 ml
Penicil·lina / Estreptomicina <sup>4</sup>	Penicil·lina G (10.000 U/ml) Estreptomicina sulfat (10 mg/ml)	100 U/ml 0,1 mg/ml	5,8 ml
Piruvat de sodi <sup>5</sup>	100 mM	1 mM	5,8 ml
Aminoàcids no essencials <sup>6</sup>	100X	1X	5,8 ml

<sup>1</sup> Per a 500 ml de medi DMEM High Glucose.

<sup>2</sup> Gibco. Inactivat 1 hora a 56°C.

<sup>3</sup> Biowest X0550-100.

<sup>4</sup> Biowest L0022-100.

<sup>5</sup> Biowest L0642-100.

<sup>6</sup> Biowest X0557-100.

**Huh7**. Aquesta és una línia cel·lular d'hepatòcits derivats d'un carcinoma cel·lular extrets d'un tumor hepàtic. Es cultiva en adherència amb DMEM/F-12 (*L0090, Biowest*) suplementat amb els següents components (**Taula 4.18**):

**Taula 4.18. Composició del medi de cultiu de la línia cel·lular Huh7**

Reactiu	Concentració inicial	Concentració final	Volum <sup>1</sup>
FBS <sup>2</sup>	-	10%	57,5 ml
L-Glutamina <sup>3</sup>	200 mM	4 mM	11,6 ml
Penicil·lina / Estreptomicina <sup>4</sup>	Penicil·lina G (10.000 U/ml) Estreptomicina sulfat (10 mg/ml)	100 U/ml 0,1 mg/ml	5,8 ml
Piruvat de sodi <sup>5</sup>	100 mM	0,5 mM	2,9 ml
HEPES <sup>6</sup>	1 M	10 mM	5,8 ml

<sup>1</sup> Per a 500 ml de medi DMEM/F-12.

<sup>2</sup> Gibco. Inactivat 1 hora a 56°C.

<sup>3</sup> Biowest X0550-100.

<sup>4</sup> Biowest L0022-100.

<sup>5</sup> Biowest L0642-100.

<sup>6</sup> Biowest L0180-100.

**LCLs.** Es tracta de dues línies cel·lulars limfoblastoïdes obtingudes després de la transformació amb el virus Epstein-Barr de limfòcits B de 2 pacients de MNGIE [96]. Aquestes cèl·lules creixen en suspensió en medi RPMI 1640 (L0501, Biowest) suplementat amb els següents components (**Taula 4.19**):

**Taula 4.19. Composició del medi de cultiu de les línies cel·lulars LCL**

Reactiu	Concentració inicial	Concentració final	Volum <sup>1</sup>
FBS <sup>2</sup>	-	15%	91,6 ml
L-Glutamina <sup>3</sup>	200 mM	2 mM	6,1 ml
Penicil·lina / Estreptomicina <sup>4</sup>	Penicil·lina G (10.000 U/ml) Estreptomicina sulfat (10 mg/ml)	100 U/ml 0,1 mg/ml	6,1 ml
Gentamicina <sup>5</sup>	50 mg/ml	50 µg/ml	610 µl
HEPES <sup>6</sup>	1 M	10 mM	6,1 ml

<sup>1</sup> Per a 500 ml de medi RPMI 1640.

<sup>2</sup> Gibco. Inactivat 1 hora a 56°C.

<sup>3</sup> Biowest. X0550-100.

<sup>4</sup> Biowest. L0022-100.

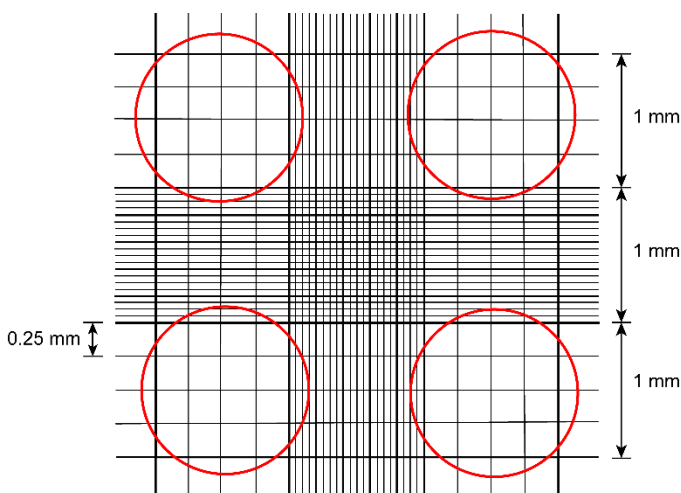
<sup>5</sup> Gibco. 15750-037.

<sup>6</sup> Biowest. L0180-100.

### 4.6.3. COMPTATGE CEL·LULAR

Es recullen les cèl·lules per tripsinització (apartat 4.6.4) i es resuspenen en un volum de medi conegut. S'utilitza el colorant blau de tripà, que tenyeix de blau únicament les cèl·lules mortes ja que el colorant pot travessar la membrana. A partir d'aquí s'utilitzen dos mètodes diferents per a comptar el número de cèl·lules.

- Recompte automàtic: S'utilitza l'aparell *Countess™ Automated Cell Counter* (*ThermoFisher*). Es barregen 10 µl de la suspensió cel·lular amb 10 µl de colorant, i es dipositen 10 µl de la mescla en una cambra de comptatge de la làmina *Countess™ Cell Counting Chamber Slides* (C10228, *ThermoFisher*) que s'introdueix a l'aparell. L'aparell compta les cèl·lules vives i mortes automàticament a partir d'una imatge.
- Recompte amb cambra de Neubauer: Igual que amb el mètode anterior es mesclen 10 µl de la suspensió cel·lular amb 10 µl de blau de tripà. Cada portaobjectes té dues cambres de recompte com la de la **Figura 4.4** i quan es cobreix amb un cobreobjectes deixa un espai (de 0,1 mm de gruix) on es permet carregar 10 µl de la suspensió cel·lular. La quadrícula és de 3 mm x 3 mm, i està dividida en 9 quadrats de 1 mm x 1 mm, cadascun dels quals està dividit en 16 quadrats més petits. Per tant, el volum que ocupen el 16 quadrats és de 0,1 mm<sup>3</sup>. Per al recompte, es compten les cèl·lules que hi ha en cadascun dels 4 quadrats grans marcats a la **Figura 4.4**.



**Figura 4.4.** Cambra de Neubauer.

Es calcula el número de cèl·lules per ml amb la següent fórmula:

$$\text{Concentració} \left( \frac{\text{cèl}}{\text{ml}} \right) = \frac{N \cdot D \cdot 10000}{L}$$

On **N** és el número de cèl·lules comptades, **D** el factor de dilució aplicat, **10000** el factor de conversió entre 0,1 µl i 1 ml, i **L** el número de quadrats comptats.

#### 4.6.4. RECOL·LECCIÓ DE CÈL·LULES

Les cèl·lules es recullen en funció del tipus de creixement que presenten.

**HEK293T i Huh7.** Creixen en adherència. Un cop les cèl·lules arriben a una confluència 90% en la placa o flascó, es dilueixen en més d'una placa o flascó seguint el següent protocol.

- Aspirar el medi gastat i rentar la placa amb tampó fosfat salí (PBS) 1X.
- Desenganxar les cèl·lules afegint un volum Tripsina-EDTA 1X (X0930-100, Biowest) que cobreixi tota la superfície de cultiu i incubar a 37°C fins que les cèl·lules es desadhereixin de la superfície.
- Recollir les cèl·lules afegint el mateix volum de medi que el que s'havia afegit de tripsina, centrifugar a 400 x g durant 5 minuts a temperatura ambient i eliminar el sobrenedant.
- Si l'objectiu és mantenir el cultiu o augmentar el número de cèl·lules, resuspendre en medi de cultiu per ressemar a una densitat menor.
- Si l'objectiu és realitzar anàlisis d'aquestes cèl·lules, rentar amb PBS 1X, centrifugar a 500 x g durant 5 minuts, eliminar el sobrenedant i guardar a -80°C fins al seu anàlisi.

**LCL.** Aquesta línia cel·lular creix en suspensió i formen agregats en el medi de cultiu. Tant per canviar de medi com per a recollir les cèl·lules es segueix el següent protocol:

- Recollir el medi i passar-lo a un tub de 15 ml o de 50 ml en funció del volum de cultiu. Centrifugar a 400 x g durant 5 minuts a temperatura ambient i eliminar el sobrenedant.
- Si l'objectiu és mantenir el cultiu o augmentar el número de cèl·lules, resuspendre en medi de cultiu per ressemar a una densitat menor.

- Si l'objectiu és realitzar anàlisis d'aquestes cèl·lules, rentar amb PBS 1X, centrifugar a 500 x g durant 5 minuts, eliminar el sobrenedant i guardar a -80°C fins al seu anàlisi.

#### 4.6.5. TRANSDUCCIÓ DE VECTORS LENTIVIRALS EN LÍNIES CEL·LULARS

Per a la transducció de línies cel·lulars es té en compte el número de cèl·lules i el títol de la suspensió vírica. S'utilitza una multiplicitat d'infecció (MOI) de 10, és a dir 10 partícules transductants per cada cèl·lula.

**HEK293T i Huh7.** Es sembren  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules per pou en una placa de 24 pous, s'afegeix 500 µl de medi de cultiu per pou i es deixen adherir 24 hores. En el moment de la transducció es compta el número de cèl·lules (apartat 4.6.3) en dos pous reservats per el comptatge. Es prepara un volum de medi suficient amb una quantitat de partícules víriques corresponen a una MOI de 10 (500 µl de medi per pou). Es canvia el medi de cada pou pel medi corresponen amb partícules víriques. S'incuba 24 hores a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i es reemplaça amb medi de cultiu fresc sense partícules víriques.

**LCLs.** Es compten les cèl·lules i s'agafa el volum corresponen a  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules. Es resuspenen en 1 ml de medi suplementat i que conté partícules lentivirals a una MOI de 10. S'incuba 24 hores a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Es recullen les cèl·lules, es centrifuguen 400 x g durant 5 minuts a temperatura ambient. S'elimina el sobrenedant que conté les partícules virals i es resuspèn en medi nou temperat.

### 4.7. ANÀLISIS HISTOQUÍMIQUES

#### 4.7.1. PREPARACIÓ MOSTRES: "SWISS ROLL"

Per a l'anàlisi histoquímic de les mostres d'intestí de ratolí, es preparen les mostres formant un *Swiss-Roll* [214]. Es tallen seccions de l'intestí corresponents al jejú d'una llargada aproximada de 2-3 cm. A continuació s'introdueix un cilindre de plàstic al lumen de l'intestí i es fa un tall a tota la llargada de l'intestí de manera que queda un rectangle amb el lumen a la part visible. A continuació, amb l'ajuda d'un palet de fusta, s'enrotlla l'intestí per la part més curta del rectangle (es va enrotllant avançant amb la llargada de l'intestí). Es submergeix en formalina 10% i es guarda 24h a 4°C.

Finalment es treu el *Swiss-Roll* del palet de fusta amb l'ajuda d'unes pinces i es procedeix a la inclusió en blocs de parafina. Es fan talls de 3 µm del bloc i es munten en un portaobjectes.

#### 4.7.2. TINCIÓ TRICROMÀTICA DE MASSON

La tinció de tricromàtica de Masson permet tenyir i visualitzar de color blau les fibres de col·lagen de tipus I. El protocol és el següent:

- Desparafinar els talls fent 2 rentats de 10 minuts en xilè; 2 rentats de 10 minuts en etanol 100%; 2 rentats de 10 minuts en etanol 90%; 2 rentats de 5 minuts en etanol 70%; i 2 rentats de 5 minuts en aigua.
- Fixar les mostres amb solució de Bouin, 1 minut al microones i 15 minuts a TA.
- Rentar les làmines durant 1 minut amb aigua i aclarir amb aigua desionitzada.
- Tenyir els nuclis amb hematoxilina de Weigert (acabada de preparar) durant 5 minuts.
- Deixar les làmines amb aigua calenta corrent durant 10 minuts i aclarir amb aigua desionitzada.
- Tenyir els citoplasmes amb la solució *Bierbich Scarlet – Acid fuchsin* durant 5 minuts. Fer 3 rentats d'1 minut amb aigua desionitzada.
- Tenyir el col·lagen incubant amb àcid fosfotúnic/fosfomolibdic durant 3 minuts 4 vegades, i sense assecar les làmines incubar amb una solució de blau d'anilina durant 10 minuts.
- Fer 3 rentats de 1 minut amb aigua desionitzada.
- Diferenciar mitjançant la incubació en una solució 1% (v/v) àcid acètic glacial durant 1 minut.
- Fer 2 rentats en aigua desionitzada.
- Deshidratar incubant amb etanol 90% durant 1 minut, a continuació 1 minut en etanol absolut i finalment 1 minut en xilè.
- Muntar les làmines amb DPX afegint una gota i col·locant el cobreobjectes al damunt.



## 4.8. PROCEDIMENTS D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

### 4.8.1. MODEL DE RATOLÍ I CONDICIONS D'ESTABLULACIÓ

El model utilitzat va ser generat prèviament per Lopez i col·laboradors [60]. La colònia d'animals WT i la d'animals dKO pels gens *Tymp* i *Upp1* van ser generades a partir d'heterozigots pels dos gens proporcionats pel laboratori de Michio Hirano (Columbia University Medical Centre, Nova York) i dues vegades s'ha realitzat un retrocreuament amb ratolins WT de la soca C57BL/6J. El fons genètic del model és C57BL/6J.

Els animals estan establulats en l'establulari de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron amb condicions d'humitat i temperatura controlades (20-22°C) i amb cicles de llum-fosc de 12 hores. Els animals disposen de menjar i beguda *ad libitum* (s'utilitza la dieta *Teklad Global 18% Protein Rodent Diet 2018, Harlan*).

Als grups d'animals sobreexposats a nucleòsids de manera crònica (**Taula 4.1**) se'ls hi afegeix un suplement de 16,6 g/L de dThd i dUrd (68,6 mM dThd i 72,3 mM dUrd) a l'aigua de beguda des del deslletament dels animals fins al final de l'estudi.

Els animals estan controlats seguint un protocol de supervisió que inclou un seguiment setmanal del pes i s'observa la presència de lesions o malalties. Els procediments realitzats estan aprovats per el Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron (número de procediment: 14-06).

### 4.8.2. GENOTIPATGE

El genotipatge es realitza a partir de l'ADN obtingut mitjançant l'extracció a partir d'un fragment d'orella o de cua (apartat 4.2.1.4). Es realitzen 3 PCRs, una per obtenir el genotip del gen *Tymp* i 2 per obtenir el genotip del gen *Upp1*.

#### 4.8.2.1. Amplificació del gen *Tymp*

El gen *Tymp* (*NC\_000081*; GeneID 72962) es troba en el cromosoma 15, té 5.406 pb i conté 11 exons. En la generació de l'al·lel KO es va introduir una inserció de 34 pb en l'exó 4 que trenca el marc de lectura. En la PCR de l'al·lel KO esperem una seqüència 34 pb de bases més llarga que la WT.

Els encebadors utilitzats per a la PCR són els següents:

- Encebador directe TPF1: AAA TGA GGT TAA GGG CCT G (posicions 1.387-1.405 corresponent al intró 3).
- Encebador revers l4R2: CCA TTG ATC ATC CTG TGA TT (posicions 1.591-1.610 corresponent al intró 4).

L'amplificació per PCR es fa utilitzant el *kit TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG Plus (R013A, TaKaRa)*. En aquest *kit* hi ha l'enzim uracil-ADN glicosilasa (UNG) que elimina l'amplificació de productes de PCR anteriors que puguin contaminar la reacció. Aquest *kit*, inclou dUTP en lloc de com a substrat de la polimerasa, de manera que quan s'incuba amb UNG en el primer pas de la PCR (10 minuts a 20°C), s'eliminen tots aquelles molècules d'ADN producte de PCRs anteriors. La composició de la mescla es troba a la **Taula 4.20**.

**Taula 4.20. Composició de la reacció de PCR per a l'amplificació del gen *Tymp* amb el *kit TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG Plus***

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
TaKaRa Taq HS (5 U/µl)	0,12	0,025 U/µl
UNG (2 U/µl)	0,25	0,02 U/µl
10x PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> ) <sup>1</sup>	2,5	1X
Mescla de dNTPs (2,5 mM cadascun) <sup>2</sup>	2	0,2 mM
Encebador directe TPF1 (2 mM)	6,25	0,5 mM
Encebador revers l4R2 (2 mM)	6,25	0,5 mM
Aigua estèril	6,62	-
ADN	1	fins a 100 ng

<sup>1</sup> 100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>.

<sup>2</sup> Conté dATP, dCTP, dGTP i dUTP.

I les condicions de la reacció d'amplificació estan detallades a la **Taula 4.21**.

**Taula 4.21. Condicions d'amplificació de la PCR**

Temperatura	Temps	Cicles
25°C	10 minuts	1
95 °C	2 minuts	
95°C	30 segons	10
55°C	30 segons	
72°C	30 segons	
95°C	30 segons	20
55°C	30 segons	
72°C	30 segons +20 segons/cicle	
72°C	7 minuts	1
4°C	∞	

Els productes de l'amplificació es corren en un gel d'agarosa del 2% (p/v) (apartat 4.2.5), on pel ratolí WT s'espera una banda de 224 pb; pel ratolí KO una banda de 258 pb; i pel ratolí heterozigot les dues bandes.

#### 4.8.2.2. Amplificació del gen *Upp1*

El gen *Upp1* (NC\_000077; GeneID 22271) es troba en el cromosoma 11, té 18163 pb i conté 9 exons. Per a la generació del KO es va substituir tot l'exó 4, intró 4 i la part 5' del exó 5, per un casset de neomicina.

Pel genotipatge del gen *Upp1*, s'amplifiquen en reaccions separades l'al·lel WT i l'al·lel KO. Els encebadors per a l'amplificació coincideixen en el revers, però s'utilitzen encebadors directe diferents.

Per l'amplificació de l'al·lel WT s'utilitzen:

- Encebador Directe pNeo-ko: CAG AAA GCG AAG GAA CAA AGC TGC TAT TGG C
- Encebador Revers p500a-ko: GTT CAG CTG TTC CCA TAT GCA AAA GTG TGG

Per l'amplificació de l'al·lel KO s'utilitzen:

- Encebador Directe p500-wt: CAG ACC CCC GAT GAC ACA GTA TAC TAA  
TGG
- Encebador Revers p500a-ko: GTT CAG CTG TTC CCA TAT GCA AAA GTG  
TGG

La composició de la mescla de reacció (**Taula 4.20**) i les condicions d'amplificació (**Taula 4.21**) són les mateixes que pel genotipatge del gen *Tymp* i el resultat s'analitza per electroforesis en gel d'agarosa 2% (p/v). L'amplificació de l'al·lel WT en la primera reacció dona una banda de 296 pb, i l'amplificació de l'al·lel KO en la segona reacció dona una banda de 420 pb. En el cas del ratolins heterozigots s'espera que les dues reaccions donin lloc al producte d'amplificació de la mida corresponent.

#### 4.8.3. INJECCIÓ INTRAVENOSA DE rAAV

El tractament amb els diferents rAAV es realitza en ratolins mascles dKO d'entre 8-10 setmanes mitjançant una injecció intravenosa a la vena caudal.

Les preparacions víriques es dilueixen en una solució salina estèril (NaCl 9 mg/ml). El càlcul de la quantitat de partícules víriques que s'han d'injectar a cada animal es calcula en funció de la dosi (genomes vírics per kg (vg/kg)) i en funció del pes de cada animal, de manera que en cada animal s'injecten 200 µl de solució.

L'animal s'introdueix en un cilindre tancat (tub retenidor) que deixa la cua lliure. S'escalfa la cua amb aigua calenta per augmentar la vasodilatació de manera que es faciliti la injecció i desinfecta amb etanol 70 % (v/v). S'administren els vectors mitjançant una injecció intravenosa amb una agulla de 27G'.

#### 4.8.4. EXTRACCIÓ I PROCESSAMENT DE MOSTRES SANGUÍNIES

Durant les primeres setmanes, es fa un seguiment de nucleòsids en plasma de cada animal. S'obtenen mostres de 100 µL de sang aproximadament cada dues setmanes entre les setmanes 4 i 20 de vida de l'animal, i posteriorment, una altra mostra als 6 i 8 mesos.

L'obtenció de mostres de sang es realitza en la vena safena. S'introdueix l'animal en un tub retenidor de manera que quedi accessible una de les dues potes del darrera.

S'immobilitza la pota a la altura del genoll, s'elimina el pèl de la pota, s'aplica una petita quantitat de vaselina per evitar la dispersió de la sang a tota la pota es punxa la vena una agulla de 25G. Es recullen 100 µl de sang amb l'ajuda d'un tub capil·lar que conté EDTA-K3 per evitar la coagulació (*Microvette® 100/200 K3E, Sarsted*).

Es dilueixen 50 µl de sang en 400 µl de PBS 1x estèril (dilució 1/9). La sang diluïda es centrifuga a 3.500 x g durant 5 minuts a 4°C, es recupera el sobrenedant, que conté el plasma diluït i s'emmagatzema el plasma a -20°C fins a la determinació de nucleòsids (apartat 4.4.1).

#### 4.8.4.1. Estudis farmacocinètics

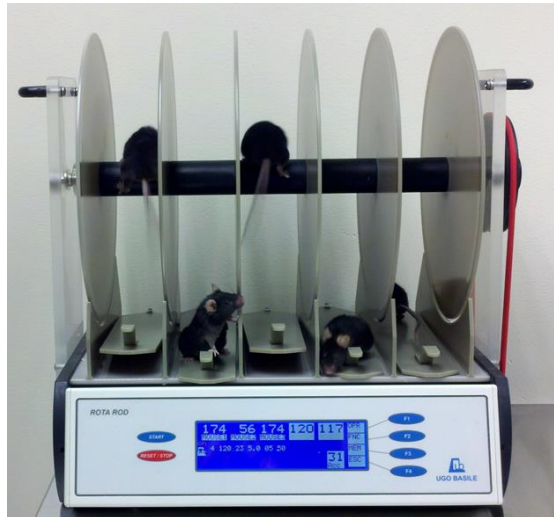
Per estudiar la farmacocinètica dels nucleòsids dThd i dUrd s'administra una dosi oral de 10 µL/g pes de l'animal d'una solució aquosa 16,6 g/L de dThd i dUrd (equival a 166 mg dThd/kg i 166 mg dUrd/kg) mitjançant una sonda gàstrica.

Es recullen mostres de sang immediatament abans de l'administració de nucleòsids, als 30 minuts, 1 hora (h), 1,5 h, 2 h, 3 h, 5 h i 8 h després de l'administració. Les mostres de sang es processen tal i com està descrit a l'apartat 4.8.4. i es mesura la concentració de nucleòsids (apartat 4.4.1.1). Els ratolins dels grups exposats (**Taula 4.1**) es mantenen sense suplement de dThd i dUrd durant les 24 hores prèvies a la primera presa de mostra i fins al final de la farmacocinètica.

#### 4.8.5. TEST ROTAROD

En ratolins de 25 setmanes d'edat s'avalua l'equilibri i la coordinació motora amb el test de *Rotarod*.

El ratolí es situa horitzontalment a sobre del cilindre rotatori de l'aparell de Rotarod (*Ugo Basile Mouse Rota-Rod, Cat No. 47600*) (**Figura 4.5**). Aquest cilindre està elevat a una altura suficientment baixa per no fer mal al animal si cau, i suficientment alta perquè no vulgui caure. El protocol inclou 3 sessions d'entrenament de 2 minuts a una velocitat constant de 4 revolucions per minut (rpm). A continuació es fa el test que consisteix en 15 segons a 4 rpm i seguit d'una acceleració constant de 1 rpm/s durant 45 segons i es mesura el temps que l'animal es queda a la barra sense caure. El temps màxim del test són 60 segons. Es duen a terme 3 sessions del test per ratolí, es determinen els temps de latència i es fa la mitjana.



*Figura 4.5. Aparell de Rotarod. Imatge obtinguda de [215].*

#### 4.8.6. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA DE CERVELL

Quan els ratolins tenen una edat d'entre 80 i 84 setmanes, es realitza una ressonància magnètica del cervell per a determinar si hi ha hiperintensitat cerebral difusa, tal i com s'havia descrit prèviament en el model [104].

Els estudis MRI es realitzen a les instal·lacions conjuntes de ressonància magnètica nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona i del Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa - Bioenginyeria, Biomaterials i Nanomedicina (CIBER-BBN) (Cerdanyola del Vallès, Catalunya), Unitat 25 de NANBIOSIS. Els experiments es duen a terme en un 7T Bruker BioSpec 70/30USR scanner (*Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany*) equipat amb una bobina de volum lineal de diàmetre interior de 72 mm com a transmissor i una bobina dedicada a la superfície cerebral del ratolí com a receptor. Les dades de MRI s'adquireixen i processen en un ordinador Linux utilitzant el programa Paravision 5.1 (*Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany*).

Inicialment, l'animal s'anestesia amb 4% (v/v) d'isoflurà amb O<sub>2</sub> a un flux de 1L/min i a continuació es posa en posició prona sobre d'un llit amb circulació d'aigua calenta i s'immobilitza el cap i el cos de l'animal. Es manté l'anestèsia amb isoflurà utilitzant una mascareta (aproximadament 1,5% (v/v) isoflurà en O<sub>2</sub> a 1 L/min), i també es monitoritza el ritme de respiració (ritme òptim 50-80 bpm) i la temperatura corporal

amb una sonda rectal (temperatura òptima  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durant tota la sessió (SA Instruments, Stony Brook, NT).

En primer lloc, s'obtenen imatges ponderades en T2 de baixa resolució en els plans axials, sagitals i coronal per utilitzar-les com a imatges de referència per a situar el ratolí. Els paràmetres d'imatge que s'utilitzen van ser els següents: temps d'eco efectiu (TE<sub>eff</sub>) 36 milisegons (ms); temps de repetició (TR) 2 segons; longitud del tren d'eco (ETL) 8; camp visual (FOV) 1,92 x 1,92 cm<sup>2</sup>; mida de la matriu (MTX) 128 x 128; gruix dels talls (ST) 1 mm; espai entre talls (gap) 0,1 mm; número de talls (NS) 14 axials, 9 sagitals i 5 coronals; i temps d'experiment (ExpT) 24 segons per orientació.

A continuació, s'obtenen mapes de T2. Per obtenir els valors de T2 s'utilitza una seqüència multi-spin multi-eco (MSME) amb els següents paràmetres: 24 ecos en el primer temps d'eco de 10 ms, temps entre ecos 10 ms, TR 3 s, FOV 1,92 cm x 1,92 cm, MTX 128 x 128, NS 8, ST 1 mm, i gap 0,1 mm, cobrint tota el cervell excloent el bulb olfactori i el cerebel, amb un ExpT de 4 minuts i 48 segons.

Per mesurar el volum dels ventricles, s'obtenen imatges ponderades en T2 d'alta resolució. Es cobreix la mateixa regió del cervell que per les imatges de T2. Per calcular el volum es seleccionen manualment les àrees del cervell a cada tall amb el software Paravision 5.0. Dins de la regió del cervell seleccionada, els píxels corresponents als ventricles es defineixen com aquells píxels que tenen valors de T2 per sobre de 60 ms. L'anàlisi es revisa i s'eliminen manualment les regions no ventriculars mitjançant el software Image J. La suma dels píxels corresponent als ventricles en tots els talls es multiplica pel volum corresponent a un píxel (0,15 x 0,15 x 1 mm<sup>3</sup>) per obtenir el volum ventricular total de cada ratolí.

#### 4.8.7. OBTENCIÓ DE TEIXITS

Els animals es sacrifiquen als 22 mesos d'edat mitjançant dislocació cervical, en tots els casos els ratolins es van sacrificar entre les 8 i les 9 del matí. Es recullen les següents mostres i teixits:

**Sang.** S'extreuen 200 µl de sang mitjançant punció intracardíaca amb una agulla de 25G. A continuació, es recull la sang amb un capil·lar que conté EDTA-K3

(*Microvette® 200 K3E, Sarsted*) per a que no es coaguli, i es deixa en gel fins al seu processament (apartat 4.8.4).

**Fetge.** El teixit es divideix en 2 meitats:

- La meitat del teixit es destina a l'extracció de dNTPs mitocondrials i es manté en gel submergit en tampó A (Tris-HCl 10mM pH 7.4; EDTA 1 mM pH 8 i sacarosa 320 mM) fins que es procedeix a l'extracció (apartat 4.4.3.1).
- La resta es congela amb nitrogen líquid i es guarda a -80°C.

**Cervell.** El teixit es divideix en 2 meitats.

- La meitat s'utilitza per a l'extracció de dNTPS i es manté en gel submergit en tampó AT (Tris-HCl 10mM pH 7,4; EGTA 1 mM pH 8; sacarosa 75 mM; sorbitol 225 mM i BSA (sense àcids grassos) 0,1% (p/v)) fins que es procedeix a l'extracció (apartat 4.4.3.1).
- L'altra meitat es congela directament amb nitrogen líquid i es guarda a -80°C.

**Intestí prim.** L'intestí prim es renta amb una solució salina (NaCl 9 mg/ml) amb l'ajuda d'una xeringa de 5 ml. Una vegada net, s'estira l'intestí i es divideix en 3 trossos d'igual llargada, el terç més proximal al estómac i el terç més distal es congelen en nitrogen líquid. El terç central es preserva en fred embolicat en una gassa mullada amb solució salina fins al seu processament per anàlisi histològica (apartat 4.7.1).

**Gastrocnemis.** S'extreuen i es congelen directament en nitrogen líquid. S'emmagatzemen a -80°C fins a la seva utilització.

Els teixits congelats a -80°C es polvoritzen amb un morter ceràmic en presència de nitrogen líquid per a evitar que es descongelin. D'aquesta manera s'assegura que en les determinacions posteriors s'utilitza una part homogènia del teixit.



## 4.9. MÈTODES D'OPTIMITZACIÓ I CLONATGE

### 4.9.1. ALGORITMES D'OPTIMITZACIÓ

Per a modificar la seqüència codificant del gen *TYMP* (GenBank: BC052211.2) s'utilitzen 4 algoritmes d'optimització de codons diferents que tenen en compte el biaix en l'ús de codó en *Homo sapiens* (Taula 4.22).

L'algoritme d'optimització A consisteix a substituir cada codó pel més freqüent que codifica el mateix aminoàcid en *Homo sapiens* (cosa que implica tenir un CAI de 1). Un cop dissenyada la nova seqüència, s'eliminen les dianes de restricció *BamH1*, *XbaI* i *XhoI* que s'han generat mitjançant la substitució del codó implicat pel segon codó més freqüent, degut a que eren dianes que s'han d'utilitzar pel clonatge d'aquesta seqüència en el vector d'expressió.

La seqüència optimitzada B es dissenya utilitzant l'eina *Eugene* (disponible a <http://bioinformatics.ua.pt/eugene/>). Els criteris que s'utilitzen per dissenyar aquesta seqüència són maximitzar el CAI, evitar estructures secundàries en l'ARN i els codons stop fora del marc de lectura i eliminar les dianes de restricció *BamH1*, *XbaI* i *XhoI*.

La seqüència optimitzada C es dissenya amb el programa *Codon Optimization Online* (COOL) (disponible a <http://cool.syncti.org/>). En aquest cas, els criteris utilitzats consisteixen a maximitzar el CAI, maximitzar l'ús de parells de codons freqüents, i eliminar les dianes de restricció *BamH1*, *XbaI* i *XhoI*.

Finalment, la seqüència optimitzada D s'obté mitjançant l'algoritme comercial *GeneOptimizer* (un software propietat de *GeneArt*, *ThermoFisher*). Aquest algoritme té en compte els següents criteris: maximitzar el CAI, evitar quan sigui possible regions amb una contingut GC molt alt (>80%) o molt baix (<30%), evitar *TATA-box* internes, *chi-sites*, llocs d'entrada de ribosomes, motius d'inestabilitat d'ARNs, seqüències repetides, estructures secundàries en l'ARN i llocs donadors i acceptors de *splicing*.

**Taula 4.22. Criteris d'optimització de codons dels diversos algoritmes**

	CAI	Parell de codons freqüents	Exclusió de dianes restricció	Estructures secundàries ARNm
<b>Seqüència optimitzada A</b>	Maximitzar	NO	SI	NO
<b>Seqüència optimitzada B</b>	Maximitzar	NO	SI	SI
<b>Seqüència optimitzada C</b>	Maximitzar	SI	SI	NO
<b>Seqüència optimitzada D</b>	Maximitzar	SI	SI	SI

#### 4.9.2. OBTENCIÓ DE SEQÜÈNCIES DE L'ADNc DE *TYMP* OPTIMITZADES

Les diferents seqüències modificades de l'ADNc de *TYMP* s'encarreguen a la plataforma *GeneArt (ThermoFisher)*. A la **Taula 4.23** s'enumeren les diferents seqüències utilitzades, i la nomenclatura utilitzada per referir-se a les seves construccions resultants al llarg de la tesi :

**Taula 4.23. Nomenclatura de les seqüències d'ADNc *TYMP* modificades i plasmidis resultants del clonatge**

Optimització	Plasmidi rebut	Plasmidi lentiviral	Vector lentiviral
ADNc <i>TYMP</i> -WT	-	p305-WT	Lenti-WT
Algoritme d'optimització A	pTYMP-OptA	p305-OptA	Lenti-OptA
Algoritme d'optimització B	pTYMP-OptB	p305-OptB	Lenti-OpB
Algoritme d'optimització C	pTYMP-OptC	p305-OptC	Lenti-OptC
Algoritme d'optimització D	pTYMP-OptD	p305-OptD	Lenti-OptD
Eliminació CG seqüència A	pTYMP-NoCGA	p305-NoCGA	Lenti-NoCGA
Eliminació CG seqüència D	pTYMP-NoCGD	p305-NoCGD	Lenti-NoCGD
Eliminació CG seqüència WT	pTYMP-NoCGwt	p305-NoCGwt	Lenti-NoCGWT

Aquestes seqüències es reben dins d'un plasmidi estàndard de clonatge de *ThermoFisher* que conté el gen de resistència a kanamicina.

Es reben 5 µg de cada seqüència modificada en forma de plasmidi liofilitzat. Es resuspèn l'ADN en 10 mM Tris-HCl pH 8, a una concentració final de 100 ng/µL (s'afegeixen 50 µl), i es deixa 2 hores a TA. A continuació es transformen *E.coli* quimiocompetents amb 10 ng dels diversos plasmidis (apartat 4.9.6) i es sembren en plaques de LB-Agar (*Bacto™ Agar, 214010 Becton Dickinson*) a una concentració del 2% (p/v) suplementat amb kanamicina a una concentració de 100 µg/ml, es deixa créixer ON a 37°C. El dia següent es seleccionen 5 colònies i s'incuba en medi 5ml LB líquid suplementat amb kanamicina a una concentració de 100 µg/ml líquid durant 14-16 hores a 37°C en agitació. S'extreu l'ADN plasmídic per *miniprep* (apartat 4.2.1.1) i es comprova que la restricció dona els fragments desitjats mitjançant electroforesis d'agarosa (apartat 4.9.3). A continuació, es fa un cultiu a gran escala del clon per a obtenir material per a fer una extracció d'ADN plasmídic per *maxiprep* (apartat 4.2.1.2). Finalment es comprova per seqüenciació Sanger de fragments d'ADN la seqüència (apartat 4.9.7) i es congela a l'ADN a -20°C fins a la seva utilització.

### 4.9.3. DIGESTIÓ DELS VECTORS AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Per a realitzar la construcció dels diferents vectors, així com per la comprovació dels clonatges es digereixen els següents plasmidis:

- **Tots els pTYMP-Opt i pTYMP-NoCG:** Per el clonatge en el vector lentiviral, es realitza una digestió amb l'enzim de restricció *BamHI*. S'esperen obtenir 2 fragments d'ADN, un de 2.401 pb i un de 1.571 pb. La composició de la reacció de restricció està detallada a la **Taula 4.24**.

**Taula 4.24. Composició de la reacció de restricció de pTYMP-OPT i pTYMP-NoCG amb *BamHI***

Reactiu	Volum	Concentració final
Tampó CutSmart® 10X <sup>1</sup>	4 µl	1X
<i>BamHI</i> -HF (20 U/µl) <sup>2</sup>	2 µl	1 U/µl
ADN plasmídic	10 µg	0,25 µg/µl
Aigua	Fins a 40 µl	

<sup>1</sup> Concentració 1X: Acetat de Potassi 50mM; Acetat de Magnesi 10mM; 100µg/ml BSA; Tris-Acetate 20mM pH 7,9; New England Biolabs.

<sup>2</sup> R3136L, New England Biolabs.

La digestió es dur a terme ON a 37°C i es comprova la mida dels fragments resultats separant-los per electroforesi en un gel d'agarosa (0,8% (p/v)) (apartat 4.2.5).

- **p305:** Es realitza una digestió amb l'enzim de restricció *BamHI*. S'esperen obtenir 2 fragments d'ADN, un de 8.442 pb i un de 971 pb. La composició de la reacció de restricció està detallada a la **Taula 4.25**.

**Taula 4.25. Composició de la reacció de restricció de p305 amb BamHI**

Reactiu	Volum	Concentració final
Tampó CutSmart® 10X <sup>1</sup>	2 µl	1X
<i>BamHI</i> -HF 20 U/µl <sup>2</sup>	2 µl	1 U/µl
p305	1 µg	0,2 µg/µl
Aigua	Fins a 20 µl	

<sup>1</sup> Concentració 1X: Acetat de Potassi 50mM; Acetat de Magnesi 10mM; 100µg/ml BSA; Tris-Acetata 20mM pH 7,9; New England Biolabs.

<sup>2</sup> R3136L, New England Biolabs.

La digestió es dur a terme ON a 37°C i es comprova la mida dels fragments resultats separant-los per electroforesi en un gel d'agarosa (0,8% (p/v)) (apartat 4.2.5).

- **Tots els p305-Opt i p305-NoCG:** Es realitza una digestió amb l'enzim de restricció *BamHI* per a comprovar si s'ha incorporat l'insert després de la lligació. S'esperen obtenir 2 fragments d'ADN, un de 8.442 pb i un de 1.571 pb. La composició de la reacció de restricció està detallada a la **Taula 4.26**.

**Taula 4.26. Composició de la restricció de p305-OPT i p305-NoCG amb BamHI**

Reactiu	Volum	Concentració final
Tampó CutSmart® 10X <sup>1</sup>	1 µl	1X
<i>BamHI</i> -HF 20 U/µl <sup>2</sup>	1 µl	2 U/µl
ADN plasmídic <sup>3</sup>	100 ng	0,01 µg/µl
Aigua	Fins a 10 µl	

<sup>1</sup> Concentració 1X: Acetat de Potassi 50mM; Acetat de Magnesi 10mM; 100µg/ml BSA; Tris-Acetata 20mM pH 7,9; New England Biolabs.

<sup>2</sup> R3136L, New England Biolabs.

<sup>3</sup> La concentració depèn de l'extracció d'ADN plasmídic per miniprep.

La digestió es dur a terme a 37°C i es comprova la mida dels fragments resultats separant-los per electroforesi en un gel d'agarosa (0,8% (p/v)) (apartat 4.2.5).

#### 4.9.4. PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS D'ADN A PARTIR DE GEL D'AGAROSA

L'ADN digerit provinent d'una reacció de restricció es carrega en un gel d'agarosa a 0,8% i es separa per electroforesi a un voltatge constant de 80V (apartat 4.2.5). Un cop comprovat que els diferents fragments s'han separat adequadament, es talla la banda del fragment que es desitja purificar amb un bisturí. La purificació del fragment d'ADN del gel d'agarosa es realitza amb el *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (28704, QIAGEN) seguint el protocol proporcionat pel propi *kit*.

#### 4.9.5. DESFOSFORILACIÓ I L·LIGACIÓ DE FRAGMENTS D'ADN

Les dues reaccions es fan utilitzant amb el *kit Rapid DNA Dephos & Ligation Kit* (4898117001, SigmaAldrich) en dos passos:

- **Desfosforilació.** Un cop digerit el vector on es vol clonar l'insert, es desfosforila per evitar la relligació sobre ell mateix. La composició de la reacció de desfosforilació està detallada a la **Taula 4.27**.

*Taula 4.27. Composició de la reacció de desfosforilació*

Reactiu	Volum	Concentració final
Vector digerit (50 ng/μl)	15 μl	37,5 ng/μl
<i>rApid Alkaline Phosphatase Buffer 10X</i> <sup>1</sup>	2 μl	1X
<i>rApid Alkaline Phosphatase</i> <sup>2</sup>	1 μl	1U
Aigua estèril	2 μl	

<sup>1</sup> 0,5M Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,5 .

<sup>2</sup> 1U/μl. Roche.

Un cop afegits tots els elements de la reacció, s'incuba a 37°C durant 30 min. Finalment s'inactiva la fosfatasa incubant 2 minuts a 75°C. Es procedeix a la lligació.

- **Lligació.** Per una banda hi ha el vector desforforilat, i per l'altra hi ha el fragment purificat (insert) que es vol clonar en el vector. Es prepara la mescla de reacció indicada a la **Taula 4.28**.

*Taula 4.28. Composició de la reacció de lligació*

Reactiu	Volum	Concentració final
Vector digerit i desfosforilat (37,5 ng/μl)	1,3 μl	5 ng/μl
Insert purificat	150 ng	15 ng/μl
<i>DNA Dilution Buffer 5X</i>	2 μl	1X
Aigua estèril	Fins a 10 μl	-
<i>T4 DNA Ligation Buffer 2X</i>	10 μl	1X
<i>T4 DNA Ligase</i> <sup>1</sup>	1 μl	0,25 U/μl

<sup>1</sup> 5U/μl. Roche.

Es mescla la reacció i s'incuba des de 30 minuts a ON a temperatura ambient. Es guarda el producte de lligació a -20°C fins a la seva utilització.

#### 4.9.6. TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

S'utilitzen dues soques d'*E.coli* quimiocompetents proporcionades pels kits *E.Coli XL10-Gold Ultracompetent Cells (200314, Agilent)* i el kit *One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. Coli (C404010, ThermoFisher)* o a partir de cèl·lules competents generades al laboratori.

Tant per la transformació de plasmidis com de reaccions de lligació es segueix el protocol següent:

- Descongelar els bacteris quimiocompetents en gel i afegir al voltant de 10 ng de l'ADN que es vol transformar (en el cas de lligacions, es transformen 10 μl de la mescla de reacció).
- Agitar suaument i incubar 30 minuts en gel.
- Aplicar a les cèl·lules un xoc tèrmic a 42°C durant 30 segons.
- Incubar novament en gel durant 2 minuts.
- Afegir 250 μL de medi LB sense antibiòtic i incubar a 37°C durant una hora en agitació a 180 rpm.

- Sembrar tot el volum en una placa de LB-Agar suplementat amb l'antibiòtic pertinent en cada cas a una concentració de 100 µg/ml.
- Incubar la placa ON a 37°C.

### Generació de cèl·lules quimiocompetents

Per a generar les cèl·lules quimiocompetents a partir d'una al·lquota d'*E.Coli XL10-Gold Ultracompetent Cells* es segueix el següent protocol:

- Créixer 50 ml del cultiu en medi LB líquid fins a una densitat òptica a 600 nm ( $OD_{600}$ )  $\leq 10^8$  cèl·lules/ml.
- Una vegada el cultiu arriba a l' $OD_{600}$  desitjada, passar el cultiu a un recipient estèril i incubar 10 minuts en gel.
- Centrifugar a 2.700 x g durant 10 minuts a 4°C.
- Eliminar tot el sobrenedant per decantació i resuspendre el precipitat en 10 ml de  $CaCl_2$  0,1M estèril (prèviament refrigerat).
- Centrifugar a 2.700 x g durant 10 minuts a 4°C.
- Eliminar completament el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 2 ml de 0,1 M  $CaCl_2$ .
- Afegir 500 µL de glicerol 50% per a que quedi una solució de glicerol 10%.
- Fer al·lquotes de 100 µL i emmagatzemar a -80°C.

#### 4.9.7. SEQÜENCIACIÓ DE FRAGMENTS D'ADN

Un cop obtinguts els plasmidis que s'utilitzaran per la producció de vectors lentivirals i comprovat per restricció que el clonatge ha funcionat correctament, es procedeix a seqüenciar el plasmidi, en la zona d'unió entre l'ADNc de TYMP i el vector de transferència. La seqüenciació s'encarrega a una empresa externa (*Macrogen*) en un sistema de seqüenciació automàtica basada en el mètode de Sanger. Els encebadors utilitzats estan detallats a la **Taula 4.29**.

**Taula 4.29. Encebadors utilitzats per la seqüenciació Sanger de fragments d'ADN**

Nom	Seqüència 5' → 3'	Direcció	Plasmidis on s'ha utilitzat
Opt1	CACTATAGGGCGAATTGGCG	Directe	pTYMP-OptA
Opt2	AGGGTTCAGGGTTCAAGGGC	Revers	pTYMP-OptA, pTYMP-OptB, pTYMP-OptC, pTYMP-OptD
Opt3	TCAGACTGAGAGGCATGG	Directe	pTYMP-OptA
Opt4	ATCCTGAGCAAGAAGCTG	Directe	pTYMP-OptA
Opt5	GGGCAGATTCGAGAGAATGCTGG	Directe	pTYMP-OptA
Opt6	CAGATTGGAGCCATGCTG	Directe	pTYMP-OptB
Opt7	CTGGTGGTGGATGTGAAG	Directe	pTYMP-OptB
Opt8	AGCTGATGGCACTGTGGAG	Directe	pTYMP-OptB
Opt9	AGCGAGGCTGACATCAGAG	Directe	pTYMP-OptC
Opt10	TTGGGAAGATTTGAGAGGATGC	Directe	pTYMP-OptC
Opt11	CGATATCAGAGGATTCGTG	Directe	pTYMP-OptD
Opt12	CCTGGGGAGATTCGAGAGAATGC	Directe	pTYMP-OptD
Opt13	ATGCCTCTCAGTCTGATGG	Revers	pTYMP-OptA
Opt14	TCAGCATGGCTCCAATCTG	Revers	pTYMP-OptB
Opt15	TGATCATGGGGACCTTGAC	Revers	pTYMP-OptC
Opt16	ATCAGCATGGCTCCGATCTG	Revers	pTYMP-OptD
p305	GTGTTCCGCATTCTGCAAGCCT	Directe	Tots les variants del p305-TYMP-Opt i del p305-TYMP-NoCG

Els resultats s'analitzen mitjançant la comparació de les seqüències amb l'eina *BLAST*.

#### 4.9.8. CLONATGE DE VECTORS LENTIVIRALS

El Dr. L. Naldini (San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Milano, Itàlia) ens va proporcionar el plasmidi que conté la informació per a sintetitzar el vector lentiviral *self-inactivated pCCL.sin.PPT.hPGK.ΔNGFR.IRESemvcv.wt.eGFP.Wpre* (p305) (**Figura 4.6**).

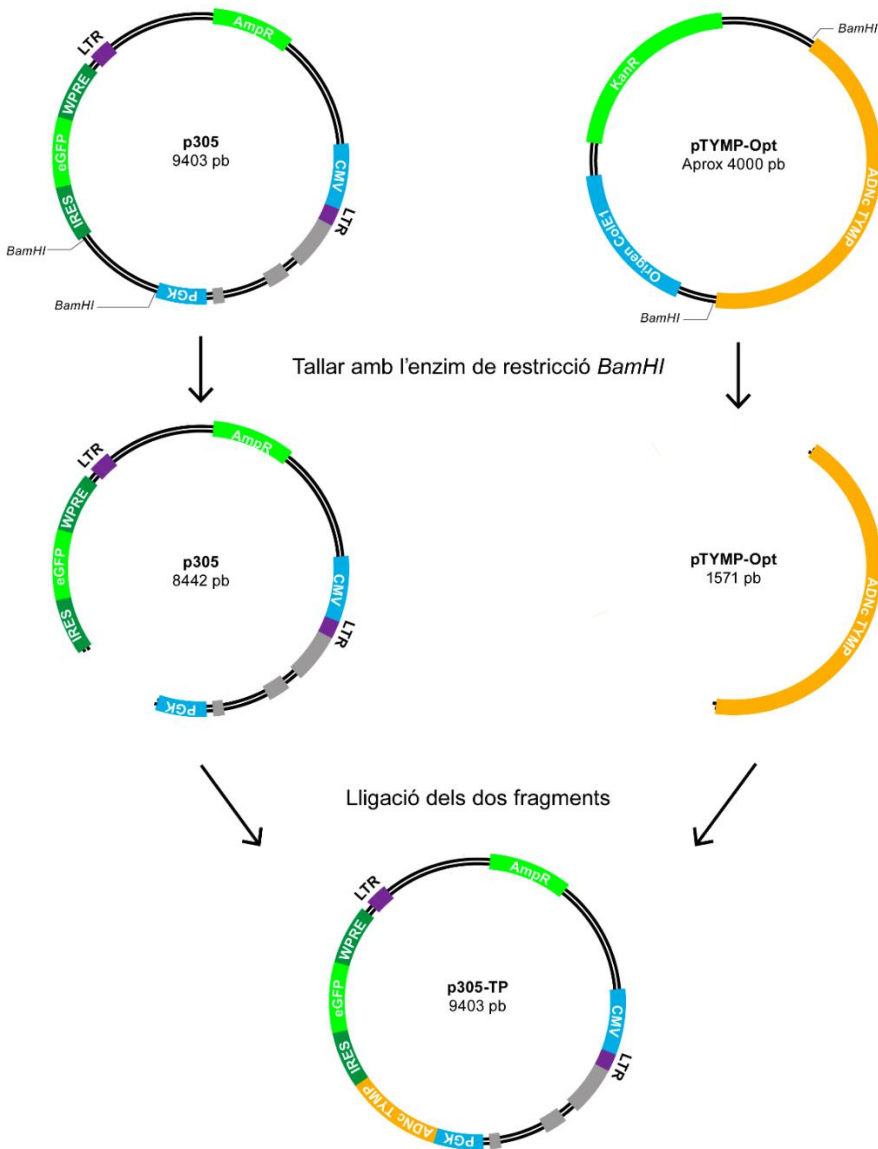
Aquest vector conté la seqüència codificant del gen *ΔNGFR* sota el control del promotor hPGK. A continuació, conté una seqüència interna d'entrada del ribosoma



(IRES) i el gen marcador de la proteïna verda fluorescent millorada (*eGFP*). Finalment, conté una seqüència de regulació posttranscripcional (*WPRE*). A partir d'aquest vector es va obtenir el p305-WT anteriorment al nostre laboratori tal i com està descrit [96].

Pel clonatge de les diferents seqüències de *TYMP* en el vector lentiviral p305 (**Figura 4.6**) es digereixen 10 µg dels plasmidis que contenen cadascuna les seqüències optimitzades amb l'enzim de restricció *BamHI* (apartat 4.9.3). Paral·lelament es digereix 1 µg del vector p305 també amb *BamHI*. Es separen les bandes per electroforesi d'agarosa i es purifiquen les bandes corresponents a l'ADNc de *TYMP* modificat (fragment de 1.571 pb) (apartat 4.9.4). Es desfosforila el fragment del vector p305 i es realitza una reacció de lligació entre el vector i el fragment purificat (apartat 4.9.5) per obtenir el plasmidi p305 amb cadascuna de les seqüències optimitzades (10.013 pb) (**Taula 4.23**), a partir dels quals es produiran els diferents vectors lentivirals.

A continuació es transformen *E.coli* quimiocompetents amb la reacció de lligació (apartat 4.9.6). El dia següent es seleccionen les colònies obtingudes i es deixen créixer en medi líquid durant 14-16 hores. S'extreu l'ADN plasmídic per *miniprep* (apartat 4.2.1.1) i es comprova per restricció que el clonatge ha sigut correcte (apartat 4.9.3). En cas que hagi estat correcte, es comprova la direcció del clonatge per seqüenciació Sanger. A continuació, es fa un cultiu a gran escala del clon per a obtenir material per a fer una extracció d'ADN plasmídic per *Maxiprep* (apartat 4.2.1.2). Finalment es comprova la identitat de tota la seqüència codificant per seqüenciació Sanger (apartat 4.9.7) i es congela a -20°C fins a la seva utilització per a la producció dels vectors lentivirals (apartat 4.10).



**Figura 4.6. Clonatge de les seqüències de l'ADNc de TYMP modificades en el plasmidi p305.** El pTYMP-OPT també pot ser el pTYMP-NoCG. ADNc TYMP: Seqüències modificades de l'ADNc del gen TYMP, AmpR: gen de la resistència a ampil·lina, BamHI: diana de restricció de l'enzim *Bam*HI, CMV: promotor del citomegalovirus, eGFP proteïna verda fluorescent millorada, IRES: seqüència d'inici de la traducció proteica, KanR: gen de resistència a la kanamicina, LTR: seqüència de repetició terminal, PGK: promotor de la fosfoglicerat quinasa, WPRE: element regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis de la marmota.

## 4.10. OBTENCIÓ DE VECTORS LENTIVIRALS

### 4.10.1. PRODUCCIÓ DE VECTORS LENTIVIRALS

Es produeixen vectors lentivirals de totes les seqüències modificades de l'ADNc de *TYMP* (**Taula 4.23**). Els vectors de transferència utilitzats per a la producció de partícules lentivirals són els procedents del clonatge en el vector p305 (apartat 4.9.8). Aquest plasmidi conté la informació genètica que s'encapsidarà en els vector virals, generant un vector lentiviral SIN de tercera generació i es necessiten 3 plasmidis auxiliars per a la producció dels vectors. El primer conté informació per sintetitzar la proteïna VSVG de l'envolta (vector envolta), el segon que expressa els gens virals *gag* i *pol* (vector d'empaquetament), i el tercer expressa el gen *rev* (vector d'expressió) (**Taula 4.30**). La producció de partícules lentivirals es realitza en la línia cel·lular productora HEK293T. El procediment es basa en cotransfectar la línia cel·lular productora amb el plasmidi de transferència i els 3 plasmidis *helpers*, en presència de polietilenimina (PEI) (*Polysciences, Inc.*).

El primer dia, es sembren entre 16 i 22 milions de cèl·lules HEK293T productores en flascons de cultius de 75 cm<sup>2</sup> de superfície (T75) per obtenir un cultiu cel·lular al voltant del 80-90% de confluència i s'afegeixen 10 ml de medi DMEM suplementat (**Taula 4.17**). S'incuben a 37°C i es deixen adherir durant 8-10 hores.

**Taula 4.30. Composició de la mescla de transfecció**

Reactiu	1 T75	Valors per cm <sup>2</sup>
Solució 150 mM NaCl estèril	1.500 µl	20 µl/cm <sup>2</sup>
Vector d'envolta (pMD2 VSVG) <sup>1</sup>	1,5 µg	20 ng/ cm <sup>2</sup>
Vector d'expressió Rev (pRSV REV) <sup>2</sup>	1,5 µg	20 ng/ cm <sup>2</sup>
Vector d'empaquetament (PMDLg PRRE) <sup>3</sup>	4,5 µg	60 ng/ cm <sup>2</sup>
Vector de transferència (p305) <sup>4</sup>	7,5 µg	100 ng/ cm <sup>2</sup>
PEI (1mg/ml, pH 7,45, filtrat a 0,22 µm)	75 µL	1 µl/ cm <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Conté el gen que codifica les glicoproteïnes de l'envolta.

<sup>2</sup> Conté el gen que codifica per la proteïna Rev.

<sup>3</sup> Conté els gens que codifiquen les proteïnes estructurals de la càpsida i els enzims necessaris per a la replicació viral.

<sup>4</sup> Per a cada p305 amb cadascuna de les seqüències es fa una producció. En tots els casos el vector conté l'ADN codificant per a sintetitzar la proteïna TP i la proteïna EGFP.

Es prepara la mescla de transfecció ADN-PEI afegint en últim lloc el PEI evitant que toqui a les parets del tub, mesclant suaument (**Taula 4.30**) i s'incuba durant 20 minuts a TA. A continuació, es canvia el medi de cultiu per 12 ml de medi DMEM suplementat temperat i es distribueix la mescla de transfecció ADN-PEI de manera homogènia per tota la superfície de cultiu amb una pipeta de vidre, vigilat que les cèl·lules no es desenganxin, i s'incuba amb les cèl·lules 16 hores a 37°C. L'endemà (dia 2) es canvia el medi de cultiu per 12 ml de medi DMEM fresc temperat.

La producció de partícules lentivirals comença a les 24 hores post-transfecció i es manté fins a 72 hores post-transfecció. A les 24 hores d'eliminar la mescla de transfecció (dia 3) es recull el medi de cultiu i es guarda a 4°C. S'afegeixen 12 ml de medi DMEM temperat i s'incuben durant 8 hores més a 37°C. Es torna recollir i guardar el medi i s'afegeixen 12 ml de medi DMEM temperat, s'incuba 16 hores a 37°C. El dia 4, es recullen els últims 12 ml de medi (36 ml de medi en total per cada flascó de cultiu T75). Es filtra el sobrenedant tot el medi de cultiu recuperat a través d'un filtre de 0,45 µm per eliminar restes cel·lulars i es procedeix a la concentració dels vectors lentivirals per ultracentrifugació a 50.000 x g durant 2 hores a 4°C. S'elimina el sobrenedant, deixant un volum d'uns 500 µl de medi que s'utilitza per a resuspendre el sediment viral. Es deixa resuspendre ON a 4°C, es fan alíquotes de 50 µl i s'emmagatzemen a -80°C.

#### 4.10.2. TITULACIÓ DE VECTORS LENTIVIRALS

Per a calcular el títol de les preparacions víriques es transdueix la línia cel·lular HEK293T amb dilucions seriades de la suspensió vírica concentrada (**Taula 4.31**). Es sembren 1 milió de cèl·lules HEK293T en cada pou d'una placa de 6 pous amb 2 ml de medi de cultiu DMEM suplementat (el mateix medi que per les produccions) (**Taula 4.17**). S'incuben durant 24 hores a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> i es compta el número de cèl·lules de 2 pous reservats pel comptatge cel·lular amb cambra de Neubauer (apartat 4.6.3). En els altres pous s'elimina el medi i es substitueix per les següents mescles de suspensió vírica i medi de cultiu DMEM (**Taula 4.31**).

**Taula 4.31. Mescles de transducció per la titulació de vectors lentivirals**

Medi de cultiu	Suspensió vírica concentrada	Suspensió vírica abans de la ultracentrifugació	Sobrenedant després de la ultracentrifugació
2 ml	0,1 µl	-	-
2 ml	0,5 µl	-	-
2 ml	1 µl	-	-
2 ml	2,5 µl	-	-
2 ml	5 µl	-	-
2 ml	10 µl	-	-
1,9 ml	-	100 µl	-
1,5 ml	-	-	500 µl

Les cèl·lules s'incuben 24 hores a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. A continuació es canvia el medi per 5 ml de medi DMEM sense vectors lentivirals i es segueix incubant en les mateixes condicions 72 hores més. Un cop finalitzat aquest període, es recullen les cèl·lules mitjançant tripsinització (apartat 4.6.4) i es resuspenen en PBS per analitzar la fluorescència d'EGFP per citometria de flux (apartat 4.10.2.1).

#### 4.10.2.1. Citometria de flux

S'utilitza un equip *FACScalibur* (Becton-Dickinson) equipat amb dos làsers, un d'argó (blau, que emet a 488nm) i un de heli-neó (vermell que emet a 635nm) i 6 fotomultiplicadors, els quals un quantifica la complexitat cel·lular (SS), un quantifica la mida cel·lular (FS) i 4 detectors de fluorescència: FL1 (530 nm), FL2 (585nm), FL3 (>650 nm) i FL4 (661 nm) que permet l'anàlisi simultani de fins a 4 fluorescències.

Es recullen les cèl·lules provinents de la titulació dels vectors lentivirals (apartat 4.10.2). Es realitza un marcatge de viabilitat utilitzant 1 µl de 7-aminoactinomicina a 1mg/ml (7-AAD; Molecular Probes). Aquesta tinció permet visualitzar aquelles cèl·lules mortes, ja que el 7-AAD és capaç de travessar la membrana de cèl·lules apoptòtiques o mortes i intercalar-se en l'ADN. Per l'anàlisi de les dades obtingudes per citometria s'utilitza el *software FCS Express* (De Novo). Es combinen el paràmetres FS i SS per a definir la població cel·lular morfològicament. i posteriorment s'analitzen per la fluorescència del marcatges realitzats (EGFP i 7-AAD). S'analitza

el percentatge de cèl·lules fluorescents per EGFP d'aquelles cèl·lules negatives per 7-AAD. S'estableix el límit de la població positiva en funció del control negatiu sense tenyir i que no expressa EGFP.

El títol de les partícules víriques es calcula amb la següent fórmula:

$$\frac{pv}{ml} = N \cdot \frac{EGFP}{100} \cdot \frac{1000}{V}$$

On **N** és el número de cèl·lules comptades a les 24 hores; **EGFP** és el percentatge de cèl·lules positives per EGFP; i **V** és el volum de la suspensió vírica afegida. Es pren el valor més alt obtingut com al títol, ja que s'assumeix que és on una cèl·lula ha estat transduïda per una sola partícula vírica (**pv**).

#### 4.11. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES

L'anàlisi estadística dels resultats es realitza amb el software *GraphPad Prism 6*. Els tests utilitzats en cada cas apareixen especificats als peus de figura. Amb finalitats estadístiques, els valors no detectables es consideren com a zero.

En el cas de l'estudi d'absorció de dThd i dUrd en sang, per cada animal, els valors del pic de concentració en plasma, s'agafa aquell punt de cada individu que té un valor de concentració més alt. Els paràmetres de l'àrea sota la corba (AUC) i el temps fins a arribar a la concentració de nucleòsids en plasma dels animals WT es calculen utilitzant el software *GraphPad Prism 6*. Les corbes s'obtenen representant les concentracions de nucleòsids en plasma vs temps i connectant els punts adjacents per línies. L'AUC es calcula mitjançant el sumatori de les àrees calculades entre cadascun dels punts amb el seu punt adjacent. Finalment el temps fins arribar a la concentració WT es calcula agafant com a concentració basal WT la concentració mitjana al temps 0 dels WT no exposats i es fa una interpolació entre els dos punts del seguiment que creuen aquesta concentració.



# 5. RESULTATS

---





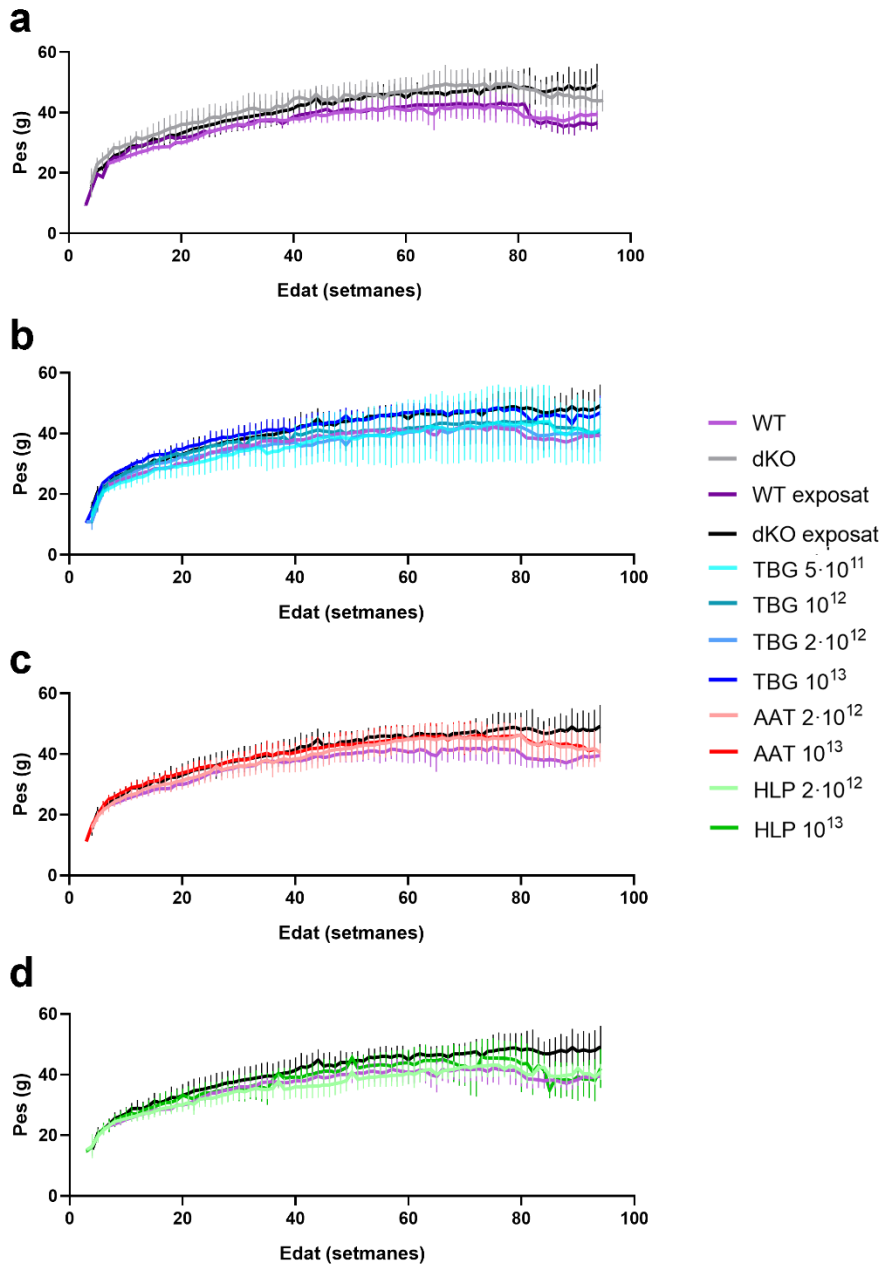
## 5.1. VALIDACIÓ DEL TRACTAMENT AMB rAAV PER A LA TERÀPIA GÈNICA DEL MNGIE EN EL MODEL DKO MILLORAT.

Tal i com està descrit més detalladament a l'apartat 4.1.1, els ratolins dels grups exposats van estar sotmesos a una aportació contínua de dThd i dUrd a la beguda (16,6 g/L de cadascun). Vam administrar els rAAV als ratolins entre les 8 i les 10 setmanes d'edat. Vam fer un seguiment durant 92-95 setmanes durant el qual vam estudiar els següents paràmetres: pes corporal dels animals, concentracions plasmàtiques de dThd i dUrd, funció motora i coordinació mitjançant el test Rotarod i estudis d'imatge per ressonància magnètica de cervell.

Vam mantenir els nucleòsids suplementats a la beguda fins al final de l'estudi, quan els ratolins tenien l'edat de 22 mesos. En aquest moment, vam sacrificar els ratolins i vam recollir-ne mostres de sang i de diversos teixits per determinar els diferents paràmetres bioquímics.

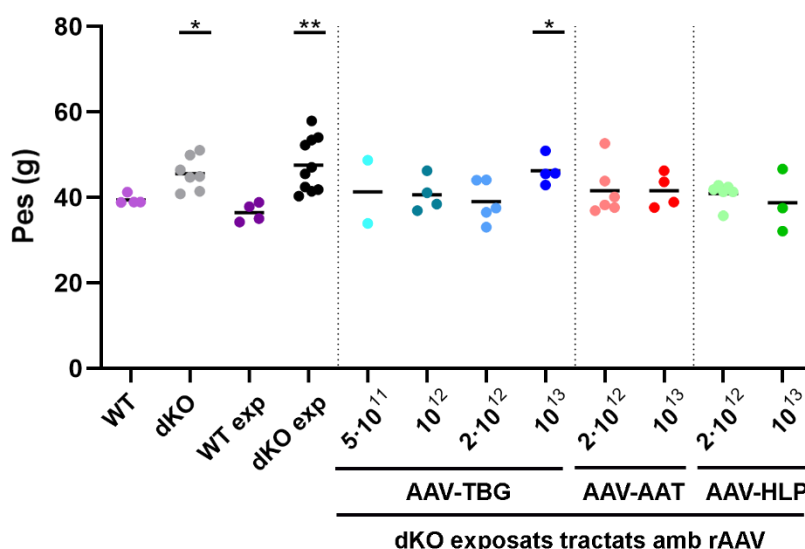
### 5.1.1. CONTROL DE PES

Durant el seguiment setmanal del pes corporal vam veure que els animals WT tenen la tendència de presentar un pes menor que els dKO tot i que la dispersió en tots els grups és molt gran (**Figura 5.1**). Al voltant de les 80-85 setmanes d'edat es va observar una disminució del pes en tots els grups que coincideix amb el punt on es va realitzar la ressonància magnètica de cervell, la qual cosa va implicar el transport dels animals a un altre centre, a més d'un procediment invasiu que inclou anestèsia, amb el consegüent estrès associat.



**Figura 5.1. Evolució del pes corporal amb l'edat.** Seguiment del pes de ratolins **a)** WT i dKO, exposats i no exposats; **b)** WT, dKO exposats sense tractar o tractats amb diferents dosis de l'AAV-TBG; **c)** WT, dKO exposats sense tractar o tractats amb diferents dosis del vector AAV-AAT i **d)** WT, dKO exposats sense tractar o tractats amb diferents dosis del vector AAV-HLP. Les dosis estan expressades en còpies del vector per kg (vg/kg). Els resultats mostren la mitjana del pes cada setmana i les barres d'error la desviació estàndard (WT n=5; WT exposat n=5; dKO n=9; dKO exposat n=13; TBG  $5 \cdot 10^{11}$  n=2; TBG  $10^{12}$  n=4; TBG  $2 \cdot 10^{12}$  n=6; TBG  $10^{13}$  n=5; AAT  $2 \cdot 10^{12}$  n=6; AAT  $10^{13}$  n=6; HLP  $2 \cdot 10^{12}$  n=6; HLP  $10^{13}$  n=5).

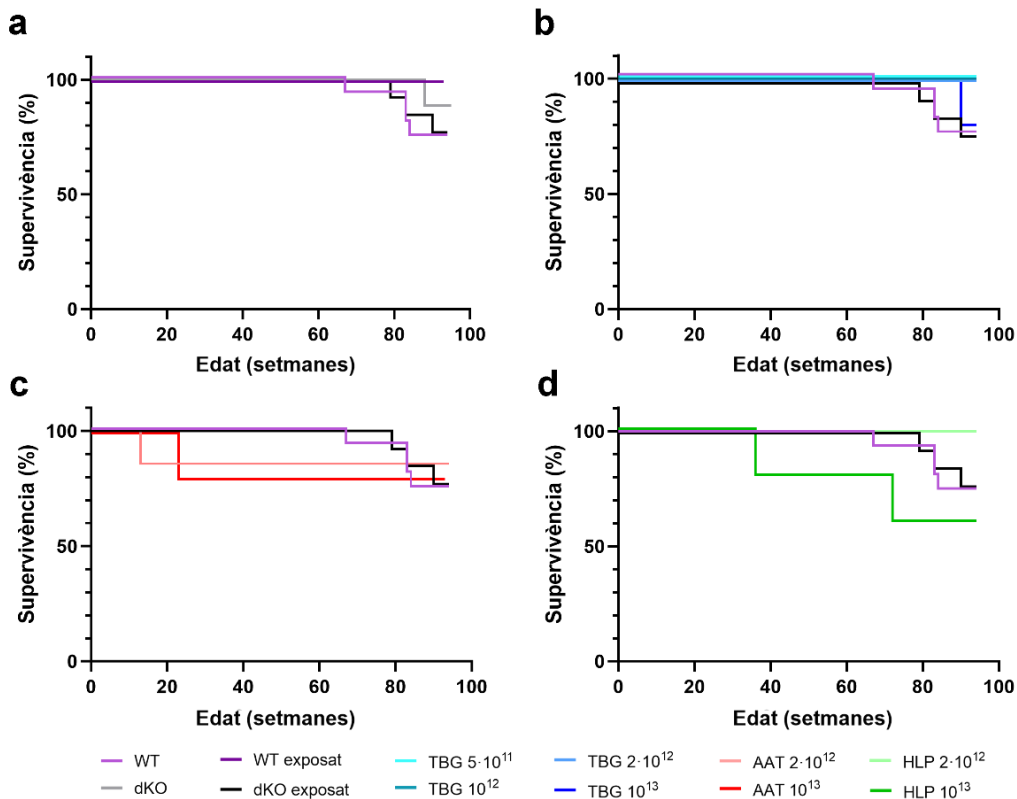
Al final de l'estudi, entre les 92 i 95 setmanes d'edat, els animals dKO, tant els exposats ( $47,6 \pm 6,3$  g) com els no exposats ( $45,6 \pm 3,9$  g), tenien un pes major que els WT ( $39,5 \pm 1,2$  g) ( $p < 0,05$ ; test U de Mann-Whitney). Els ratolins tractats amb rAAV van recuperar el pes dels animals WT, excepte en els animals tractats amb l'AAV-TBG a la dosi de  $10^{13}$  vg/kg ( $46,2 \pm 3,4$  g) (**Figura 5.2**).



**Figura 5.2. Pes corporal en ratolins al final de l'estudi.** Pes al final de l'estudi en ratolins WT ( $n=4$ ) i dKO ( $n=7$ ) no exposats, WT exposat (WT exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO exp) ( $n=10$ ) i tractats amb rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )) entre les 92 i 95 setmanes d'edat (aproximadament 22 mesos). Les línies horitzontals indiquen la mediana de cada grup. Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup WT (\*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

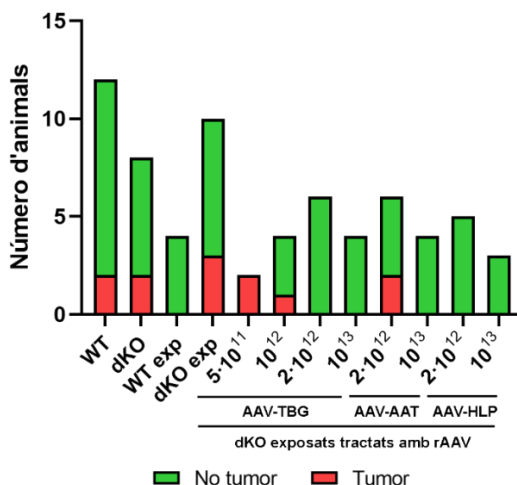
### 5.1.2. ESTUDI DE SUPERVIVÈNCIA

S'havia descrit prèviament que la supervivència dels ratolins dKO estava reduïda respecte els animals WT [104]. Tot i així, en el nostre cas dels ratolins, no vam observar una disminució de la supervivència en cap dels grups d'animals (**Figura 5.3**). Els ratolins dKO, tant els exposats com els no exposats, no van presentar una supervivència menor que els WT. El tractament amb rAAV tampoc va provocar cap variació en la supervivència.



**Figura 5.3. Supervivència dels ratolins.** *a)* Ratolins WT i dKO exposats i no exposats. *b)* Ratolins tractats amb el vector AAV-TBG a diferents dosis. *c)* Ratolins tractats amb el vector AAV-AAT a diferents dosis. *d)* Ratolins tractats amb el vector AAV-HLP a diferents dosis. Les dosis estan expressades en còpies del vector per kg (vg/kg). WT n=12; WT exposat (Exp) n=4; dKO n=8; dKO exposat (Exp) n=10; TBG 5·10<sup>11</sup> n=2; TBG 10<sup>12</sup> n=4; TBG 2·10<sup>12</sup> n=6; TBG 10<sup>13</sup> n=4; AAT 2·10<sup>12</sup> n=6; AAT 10<sup>13</sup> n=4; HLP 2·10<sup>12</sup> n=6; HLP 10<sup>13</sup> n=3. S'han exclòs de l'estudi 1 ratolí del grup de WT exposat i 1 ratolí del grup AAT 10<sup>13</sup> degut a que es van morir durant el procediment de MRI.

Tot i que els rAAV no s'han associat a cap malaltia, hi ha certs estudis que els associen a una major incidència de tumors hepàtics [155]. En el nostre cas, en el moment del sacrifici, vam trobar tumors en 13 de 59 animals que van arribar al final de l'estudi (dels quals 6 en el pulmó, 2 en el fetge, 2 en la melsa, 1 en el fetge i el pulmó, 1 en el ronyó i 1 en l'intestí prim) (Figura 5.4).



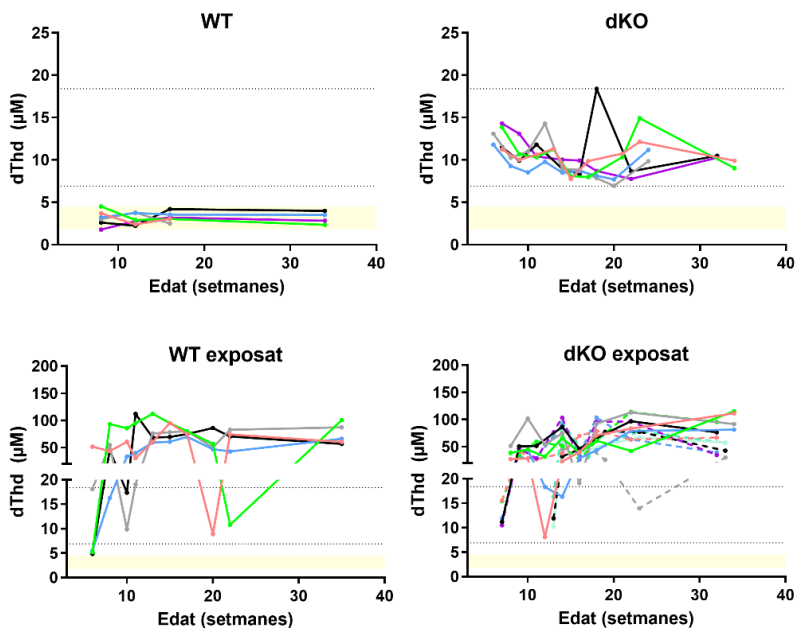
**Figura 5.4. Presència de tumors en el moment del sacrifici.** Les columnes representen el número de ratolins estudiats (WT (n=4) i dKO (n=7) no exposats, WT exposats (WT exp) (n=4) i ratolins dKO exposats no tractats (dKO exp) (n=10) i tractats amb 3 rAAVs a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg (n=2),  $10^{12}$  vg/kg (n=4),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=5) i  $10^{13}$  vg/kg (n=4); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6),  $10^{13}$  vg/kg (n=4); AAV-HLP:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i; HLP  $10^{13}$  vg/kg (n=3)). En verd es representa els que no va presentar tumors i en vermell els que va presentar tumors en qualsevol teixit.

### 5.1.3. MONITORITZACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE dThd I dUrd EN PLASMA

La concentració de dThd i dUrd en plasma és una variable útil per a avaluar l'efecte del tractament amb rAAV *in vivo*. Per aquesta raó, vam monitoritzar aquest paràmetre entre les edats de 4 i 35 setmanes. En general, el comportament dels dos nucleòsids va ser molt semblant i en els resultats només es mostren les figures corresponents a la dThd. Els resultats corresponents a la dUrd es troben a l'annex I.

Com s'havia vist anteriorment, la mitjana de la concentració de dThd circulant en animals dKO és entre 2 i 4 vegades superior a la concentració dels animals WT [99,100]. En el cas dels WT, el rang va oscil·lar entre 1,8  $\mu\text{M}$  i 4,5  $\mu\text{M}$  mentre que en el cas dels dKO, el rang de concentració va ser entre 6,9 i 18,4  $\mu\text{M}$  (**Figura 5.5**). L'exposició a nucleòsids en la beguda va provocar un increment en la concentració de nucleòsids circulants per sobre dels valors de concentració de dKO, tant en animals WT exposats ( $64,0 \pm 27,2 \mu\text{M}$  de dThd) com en animals dKO exposats ( $53,3 \pm 29,7 \mu\text{M}$  de dThd). No obstant, als dos

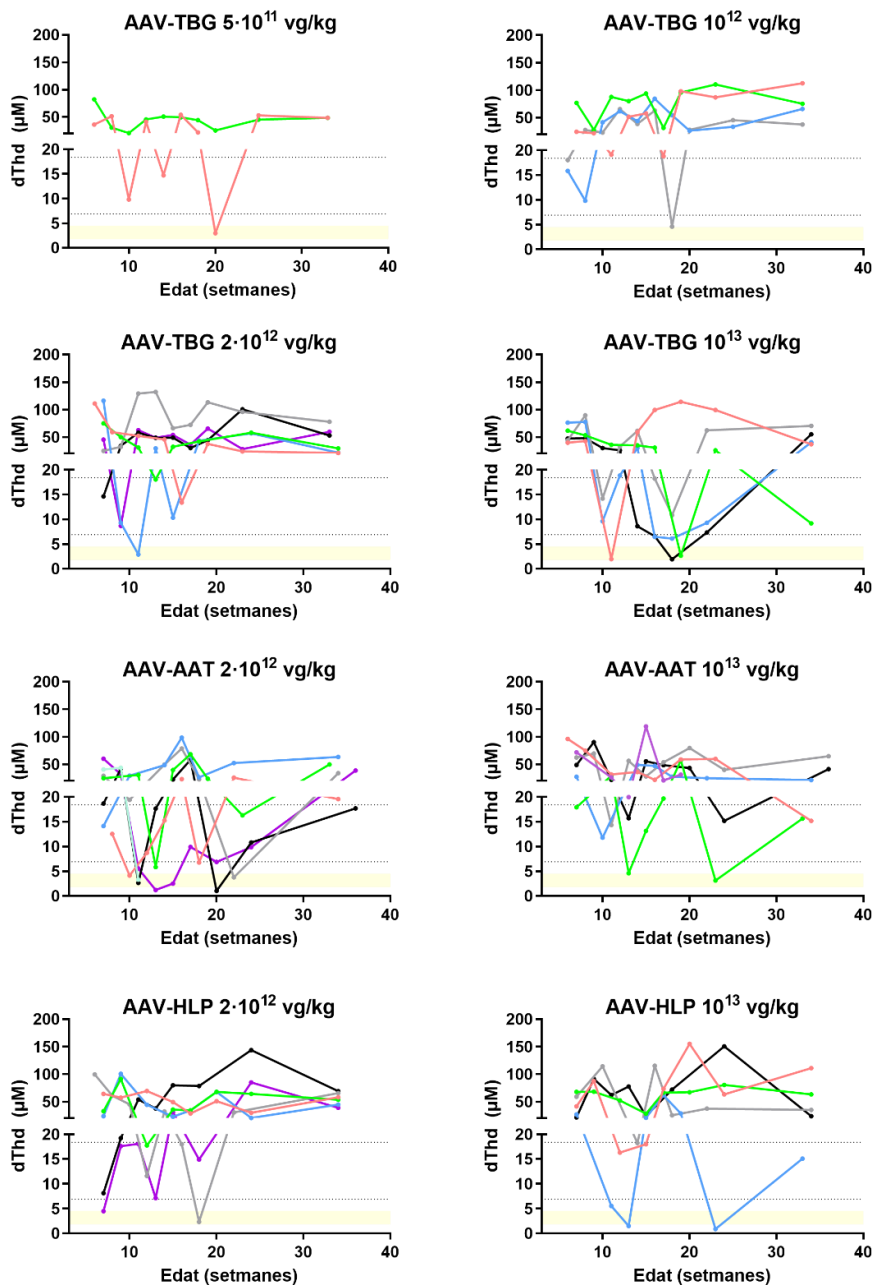
grups hi havia una gran variació de la concentració plasmàtica de dThd compresa entre 8,9 i 103  $\mu\text{M}$  de dThd en els WT i 3,1 i 112  $\mu\text{M}$  en els dKO (**Figura 5.5**).



**Figura 5.5. Seguiment de la concentració de dThd plasmàtica en ratolins no tractats.** Concentració de dThd en plasma entre 4 i 35 setmanes d'edat en ratolins WT ( $n=6$ ), dKO ( $n=6$ ), WT exposat ( $n=5$ ) i dKO exposats no tractats ( $n=13$ ). Cada línia representa un ratolí i cada punt una mesura. L'àrea ombrejada representa el rang de concentració plasmàtica de ratolins WT, i la zona entre les línies horitzontals de punts negres, el rang de concentració plasmàtica de ratolins dKO.

En ratolins dKO exposats a nucleòsids i tractats amb rAAV també es va observar que les concentracions plasmàtiques de nucleòsids fluctuaven molt a diferents temps, independentment del vector i la dosi. Tot i així, es va observar que la concentració mitjana de dThd circulant era més baixa que la dels ratolins no tractats i en molts casos la concentració de dThd es trobava dins del rang de dKO o fins i tot dels WT no exposats (**Figura 5.6**).

És molt possible que la gran dispersió dels resultats obtinguts sigui deguda a que l'administració de la sobrecàrrega de nucleòsids va ser a través de la beguda que els animals disposen *ad libitum*. Per tant, la concentració de nucleòsids pot variar en funció del volum d'ingesta i del temps que transcorre entre l'última ingesta d'aigua i la recollida de la mostra de sang. Per aquesta raó, vam fer un estudi dels paràmetres farmacocinètics dels nucleòsids administrats, que és una situació més controlada experimentalment.



**Figura 5.6. Seguiment de la concentració de dThd plasmàtica en ratolins dKO tractats amb rAAV.** Concentració de dThd en plasma entre 4 i 35 setmanes d'edat en ratolins dKO exposats i tractats amb 3 rAAVs a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=5$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=7$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=6$ ); AAV-HLP:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=5$ )). L'àrea ombrejada representa el rang de concentració plasmàtica de ratolins WT, i la zona entre les línies horitzontals de punts negres, el rang de concentració plasmàtica de ratolins dKO.

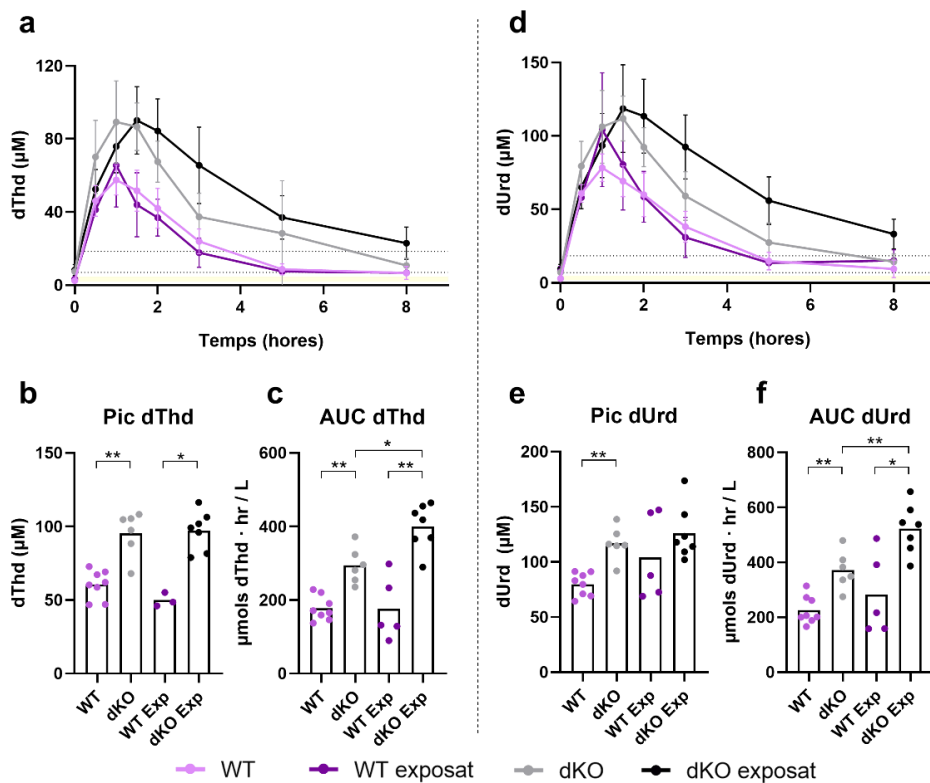


### 5.1.3.1. Farmacocinètica de dThd i dUrd

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobrecàrrega dels nucleòsids sobre les concentracions plasmàtiques de dThd i dUrd de forma més controlada vam realitzar un assaig de farmacocinètica en ratolins de 35-40 setmanes d'edat. Vam administrar oralment una dosi de dThd i dUrd (166 mg/kg) i vam determinar les concentracions plasmàtiques de dThd i dUrd a diferents temps abans i després de l'administració fins a les 8 hores. Per tal d'evitar interferències, vam retirar el suplement de nucleòsids de la beguda les 24 hores anteriors a la farmacocinètica a tots els ratolins dels grups exposats.

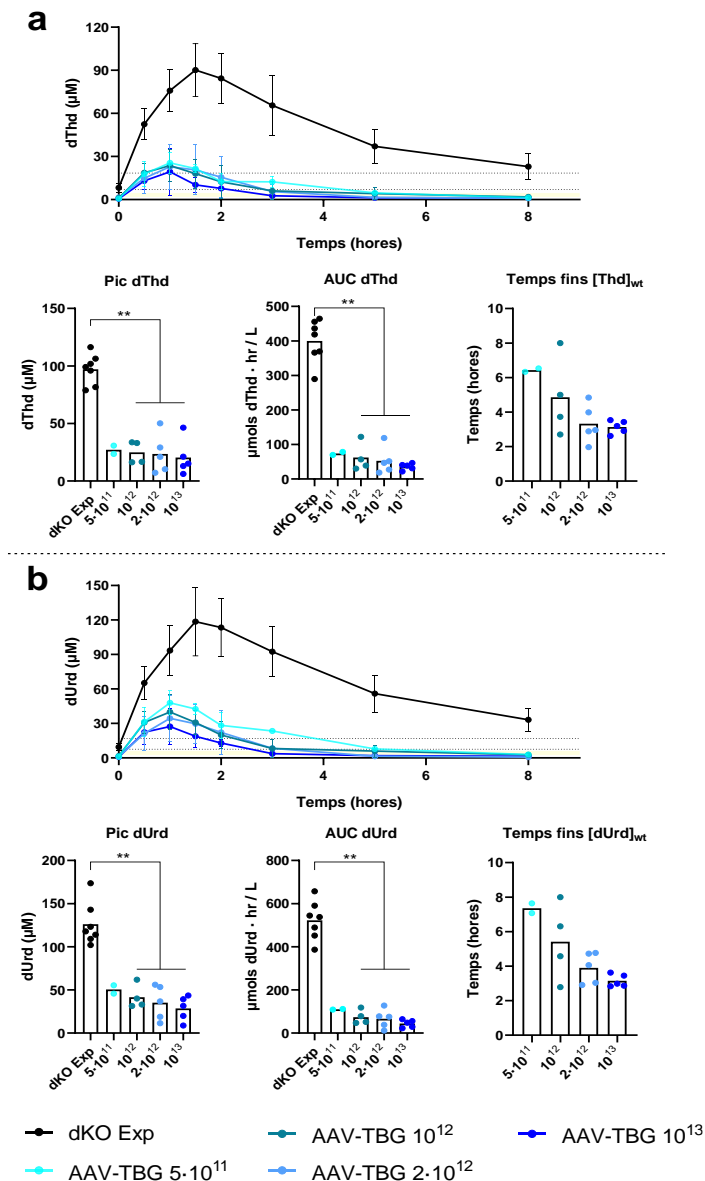
Vam observar que la concentració de nucleòsids circulants es van incrementar ràpidament després de la dosi oral, arribant al pic màxim 1-1,5 hores post administració (**Figura 5.7a i Figura 5.7d**). Posteriorment, en els ratolins WT, els nucleòsids disminuïen progressivament fins a les 8 hores, on la concentració encara romanía per sobre dels valors basals. De manera similar, en els ratolins dKO, que no disposen dels enzims necessaris pel catabolisme d'aquests nucleòsids, la concentració també es va reduir progressivament, molt possiblement degut a una excreció en l'orina. Vuit hores post administració, no s'aconseguia recuperar la concentració de nucleòsids basal ni en ratolins WT ni en ratolins dKO, tant exposats com no exposats.

Tot i així, les concentracions de nucleòsids en el pic màxim en plasma van ser més altes en els ratolins dKO, tant en el grup dKO exposat (dThd:  $97,2 \pm 13,3 \mu\text{M}$ ; dUrd:  $126 \pm 24,6 \mu\text{M}$ ) com el grup no dKO exposat (dThd:  $95,4 \pm 15,2 \mu\text{M}$ ; dUrd:  $117 \pm 15,4 \mu\text{M}$ ) que el dels ratolins WT, tant en el grup WT exposat (dThd:  $49,9 \pm 4,7 \mu\text{M}$ ; dUrd:  $104 \pm 38,8 \mu\text{M}$ ) com el grup WT no exposat (dThd:  $60,5 \pm 9,6 \mu\text{M}$ ; dUrd:  $79,7 \mu\text{M} \pm 10,5 \mu\text{M}$ ) (**Figura 5.7b i Figura 5.7e**). De forma similar, quan vam calcular l'àrea sota la corba (AUC) com a indicador d'exposició a nucleòsids, vam observar que els ratolins dKO tenien una major AUC de dThd i dUrd que els ratolins WT. Curiosament, també vam observar que l'AUC era significativament major en els ratolins que dKO que havien estat exposats a sobrecàrrega de nucleòsids durant tota la seva vida que els no exposats ( $p < 0,05$ ; test U de Mann-Whitney) (**Figura 5.7c i Figura 5.7f**).



**Figura 5.7. Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins no tractats amb rAAV.** Corba de concentracions plasmàtiques de dThd (a) i dUrd (d) abans (0 h) i després (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h i 8 h) d'una administració oral de dThd i dUrd (166 mg/kg) en ratolins WT exposats (WT Exp) ( $n=5$ ) i no exposats ( $n=8$ ) i dKO exposats (dKO Exp) ( $n=7$ ) i no exposats ( $n=6$ ) d'entre 35 i 45 setmanes d'edat. La regió en groc indica el rang de concentració basal en ratolins WT i la regió entre línies de punts el rang de concentració basal dels ratolins dKO. En la corba, cada punt representa la mitjana  $\pm$  rang. Representació gràfica del pic concentració de dThd (b) i de dUrd (e); i de l'àrea sota la corba (AUC) calculada per la dThd (c) i la dUrd (f). La barra indica la mitjana i cada punt representa un ratolí individualment. Els asteriscs indiquen diferències significatives (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

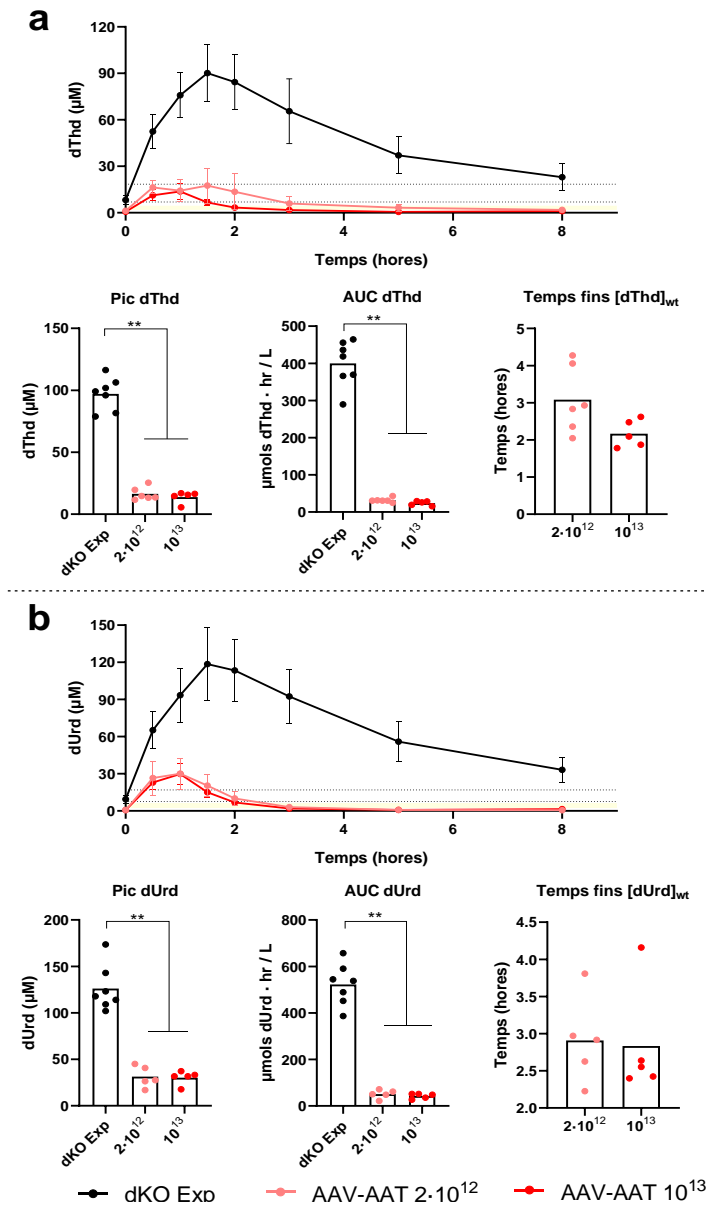
Quan vam estudiar la farmacocinètica dels nucleòsids en els ratolins tractats amb rAAV, vam observar que als ratolins dKO exposats tractats amb l'AAV-TBG a les dosis de  $5 \cdot 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \cdot 10^{12}$ ,  $10^{13}$  vg/kg la concentració en plasma de dThd i dUrd abans de l'administració oral de la solució de nucleòsids, estava dins dels rang dels ratolins WT o inclús inferior en tots els animals (Figura 5.8).



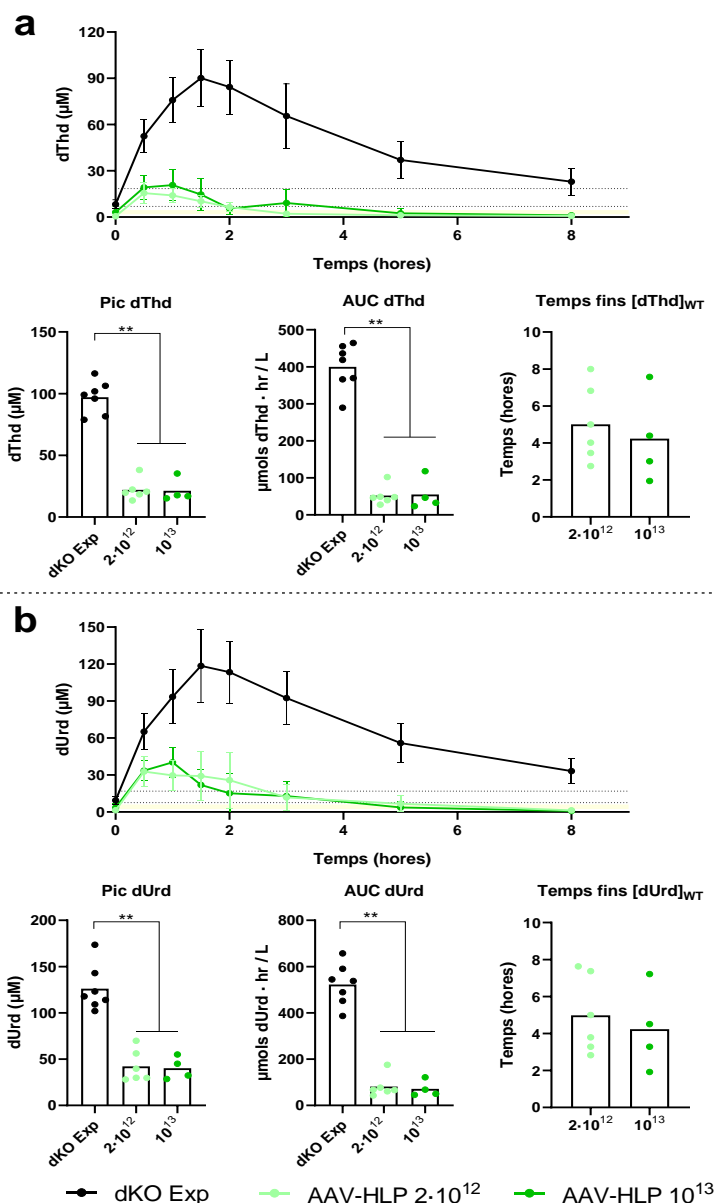
**Figura 5.8. Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins tractats amb l'AAV-TBG.** Concentracions plasmàtiques de dThd (a) i dUrd (b) abans (0 h) i després (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h i 8 h) d'una administració oral de dThd i dUrd (166 mg/kg) en ratolins dKO exposats d'entre 35 i 45 setmanes d'edat no tractats (dKO Exp n=7) i tractats amb l'AAV-TBG a les dosis de 5·10<sup>11</sup> vg/kg (n=2), 10<sup>12</sup> vg/kg (n=4), 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=5), 10<sup>13</sup> vg/kg (n=5). Cada punt representa la mitjana ± rang. La regió en groc indica el rang de concentració en ratolins WT i la regió entre línies de punts el rang de concentració dels ratolins dKO. Representació gràfica del pic de concentració de dThd (a) i de dUrd (b); àrea sota la corba (AUC) de dThd (a) i de dUrd (b) i temps per normalitzar la concentració de dThd (a) i dUrd (b). La barra indica la mitjana i cada punt representa un ratolí individualment. Els asteriscs indiquen diferències significatives ( \*\*p<0,01; test U de Mann-Whitney).

Els pics de concentració plasmàtica de dThd i dUrd es van observar una hora després de la dosi, i eren significativament inferiors als pics dels dKO exposats sense tractar ( $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney), excepte en ratolins tractats amb la dosi de  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg on les concentracions van ser clarament més baixes, tot i que el número de mostres no era prou gran per tenir poder estadístic ( $n=2$ ). L'AUC de la concentració de dThd en els grups tractats amb rAAV encara va presentar una major reducció respecte els dKO sense tractar. A més el tractament amb l'AAV-TBG va produir una reducció de la concentració circulant de dThd i dUrd més ràpida que en animals no tractats, de manera que van arribar a valors basals d'animals WT abans de les 8 hores (per la dThd els temps van ser de  $6,4 \text{ h} \pm 0,1 \text{ h}$  pels ratolins tractats amb l'AAV-TBG a la dosi de  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ;  $4,9 \pm 2,3 \text{ h}$  per la dosi de  $10^{12}$  vg/kg;  $3,3 \pm 1,1 \text{ h}$  per la dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg;  $3,1 \pm 0,9 \text{ h}$  per la dosi de  $10^{13}$  vg/kg). També vam observar, que el pic de concentració, l'AUC i el temps per normalitzar la concentració de nucleòsids es reduïen de manera dosi-depenent (**Figura 5.8**).

En els grups tractats amb els altres dos vectors, AAV-AAT o AAV-HLP, tots els animals menys un (del grup tractat amb el vector HLP  $10^{13}$  vg/kg) tenien concentracions de nucleòsids inicials a dins del rang dels WT o inferior (**Figura 5.9 i Figura 5.10**). Els pics de concentració plasmàtica de dThd i dUrd es va trobar entre 0,5 i 1,5 hores post administració, i en totes les dosis dels dos vectors eren significativament inferiors als pics dels dKO exposats sense tractar ( $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney) (**Figura 5.9 i Figura 5.10**). Com amb l'AAV-TBG, en aquests dos vectors també es van observar reduccions significatives en l'AUC de la dThd. El tractament amb aquests dos vectors també va reduir la concentració circulant de dThd i dUrd a concentració basals de dThd d'animals WT en menys de 8 hores (per la dThd en els ratolins tractats amb l'AAV-AAT a la dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg aquest temps va ser de  $2,9 \pm 0,7 \text{ h}$ , i de  $2,8 \pm 0,7$  per la dosi de  $10^{13}$  vg/kg; i pels animals tractats amb l'AAV-HLP, els temps van ser de  $4,9 \pm 2,0$  a la dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg i de  $4,2 \pm 2,6$  a la dosi de  $10^{13}$  vg/kg).

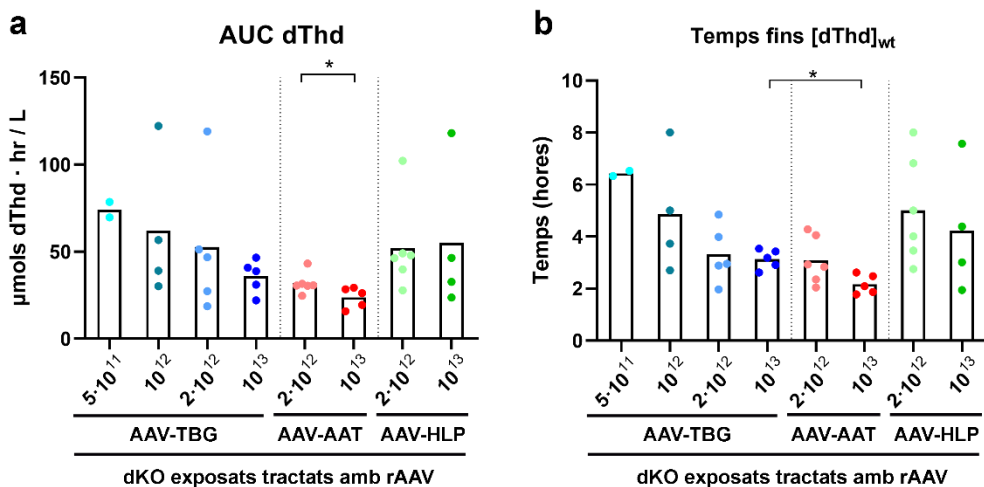


**Figura 5.9. Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins tractats amb l'AAV-AAT.** Concentracions plasmàtiques de dThd (a) i dUrd (b) abans (0 h) i després (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h i 8 h) d'una administració oral de dThd i dUrd (166 mg/kg) en ratolins dKO exposats d'entre 35 i 45 setmanes d'edat no tractats (dKO Exp n=7) i tractats amb l'AAV-AAT a les dosis de, 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6), 10<sup>13</sup> vg/kg (n=5). Cada punt representa la mitjana ± rang. La regió en groc indica el rang de concentració en ratolins WT i la regió entre línies de punts el rang de concentració dels ratolins dKO. Representació gràfica del pic de concentració de dThd (a) i de dUrd (b); àrea sota la corba (AUC) de dThd (a) i de dUrd (b) i temps per normalitzar la concentració de dThd (a) i dUrd (b). La barra indica la mitjana i cada punt representa un ratolí individualment. Els asteriscs indiquen diferències significatives (\*\*p<0,01; test U de Mann-Whitney).



**Figura 5.10. Farmacocinètica de dThd i dUrd en ratolins tractats amb l'AAV-HLP.** Concentracions plasmàtiques de dThd (a) i dUrd (b) abans (0 h) i després (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h i 8 h) d'una administració oral de dThd i dUrd (166 mg/kg) en ratolins dKO exposats d'entre 35 i 45 setmanes d'edat no tractats (dKO Exp  $n=7$ ) i tractats amb l'AAV-HLP a les dosis de,  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ),  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ). Cada punt representa la mitjana  $\pm$  rang. La regió en groc indica el rang de concentració en ratolins WT i la regió entre línies de punts el rang de concentració dels ratolins dKO. Representació gràfica del pic de concentració de dThd (a) i de dUrd (b); àrea sota la corba (AUC) de dThd (a) i de dUrd (b) i temps per normalitzar la concentració de dThd (a) i dUrd (b). La barra indica la mitjana i cada punt representa un ratolí individualment. Els asteriscs indiquen diferències significatives (\*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

Quan vam comparar l'efecte dels diferents rAAVs entre ells, vam veure el tractament amb l'AAV-AAT a la dosi de  $10^{13}$  vg/kg és la que redueix les concentracions plasmàtiques de dThd i dUrd a concentracions basals de WT de forma més ràpida (mitjana dThd:  $2,2 \pm 0,4$  hores; mitjana dUrd:  $2,8 \pm 0,7$  hores després de l'administració oral) (**Figura 5.11b**). Els ratolins tractats a la dosi de  $10^{13}$  vg/kg amb el vector AAV-AAT, també mostren el pic de dThd i dUrd més baix (dThd:  $13,8 \pm 4,7$   $\mu\text{M}$ ; dUrd:  $30,3 \pm 7,4$   $\mu\text{M}$ ) i l'àrea sota la corba més petita (dThd:  $23,8 \pm 5,9$   $\mu\text{mol} \cdot \text{h} / \text{L}$ ; dUrd:  $42,8 \pm 11,2$   $\mu\text{mol} \cdot \text{h} / \text{L}$ ) (**Figura 5.11a**).

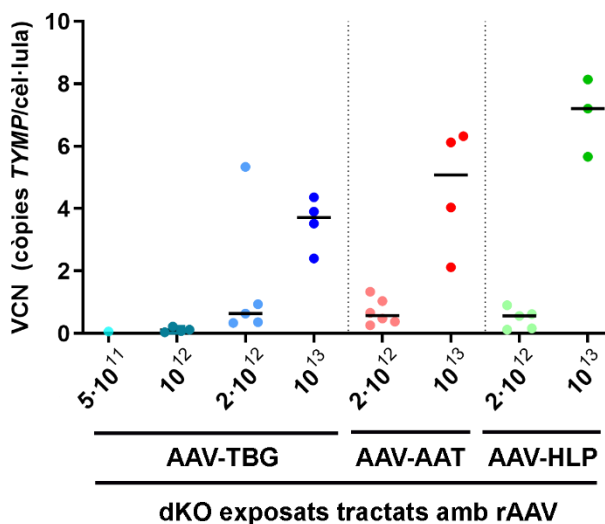


**Figura 5.11. Comparació dels resultats de la farmacocinètica entre vectors.** a) AUC de dThd. b) Temps fins reduir la dThd a concentracions basal de WT. Les barres representa la mitjana i cada punt valor d'un ratolí. La n de cada grup és la mateixa que en les Figura 5.8, Figura 5.9 i Figura 5.10. Els asteriscs indiquen diferències significatives (\* $p < 0,05$ ; test U de Mann-Whitney).

#### 5.1.4. NÚMERO DE CÒPIES DEL VECTOR

Per a poder determinar el grau de transducció en fetge i la potència dels promotors utilitzats en els diferents vectors, vam quantificar el número de còpies del vector per cèl·lula (VCN) en fetge mitjançant qPCR (**Figura 5.12**).

L'administració del vector TBG va resultar en un VCN detectable als 22 mesos en fetge en tots els ratolins tractats (rang: 0,05-5,3 còpies del vector/cèl·lula). Vam observar que el VCN als ratolins tractats amb el AAV-TBG va augmentar de manera dosi dependent i correlacionava amb la dosi administrada ( $r$  de Pearson  $r=0,9566$ ,  $p < 0,05$ ;  $n=14$ ).



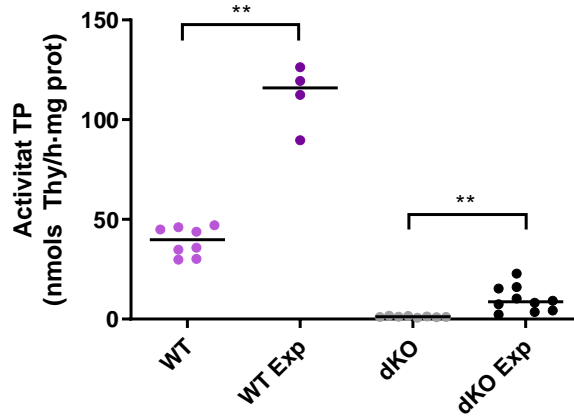
**Figura 5.12. VCN en fetge de ratolins dKO exposats i tractats amb rAAV.** Ratolins tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=1$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup.

Els ratolins tractats amb els vectors AAV-AAT i AAV-HLP amb una dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg tenien l'eficiència de transducció similar a la dels tractats AAV-TBG, mentre que amb una dosi de  $10^{13}$  vg/kg el VCN tendia a ser major en els ratolins tractats amb el vector AAV-AAT (rang 2,1 – 6,3) i amb el vector AAV-HLP (rang 5,7 – 8,1), tot i que les diferències no eren estadísticament significatives (**Figura 5.12**).

### 5.1.5. ACTIVITAT TP EN FETGE

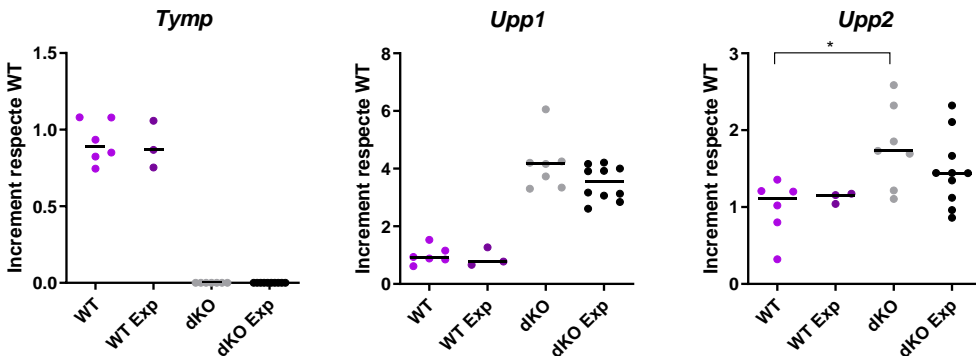
Per tal d'avaluar l'eficiència d'expressió de *TYMP* amb els diferents vectors vam quantificar l'activitat TP al fetge dels animals tractats i no tractats amb els rAAV. El primer que vam observar és que l'exposició crònica a dThd i dUrd va provocar un increment significatiu de l'activitat TP al fetge, tant en ratolins WT (de  $40 \pm 7$  nmols Thy/h·mg prot en ratolins WT fins a  $112 \pm 16$  nmols Thy/h·mg prot en WT exposats) com en ratolins dKO no tractats amb rAAVs (de  $1,2 \pm 0,3$  nmols Thy/h·mg prot en ratolins dKO fins a  $10,0 \pm 6,4$  nmols Thy/h·mg prot en dKO exposats) (**Figura 5.13**).





**Figura 5.13. Efecte de l'exposició a dThd i dUrd sobre l'activitat TP en fetge.** Activitat TP en fetge de ratolins no exposats (WT, n=8; dKO n=8), i exposats (WT Exp n=4; dKO Exp n=10) a dThd i dUrd a la beguda. Les línies horitzontals indiquen la mediana de cada grup. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives (\*\*p<0,01; test U de Mann-Whitney).

Per a determinar l'origen de la diferència d'activitat TP entre els ratolins exposats i els no exposats vam determinar els nivells d'expressió d'ARNm de les 3 proteïnes que poden aportar una activitat TP en ratolins: timidina fosforilasa (gen *Tymp*), uridina fosforilasa 1 (gen *Upp1*) i uridina fosforilasa 2 (gen *Upp2*), però no vam observar diferències significatives en els nivells d'ARNm de cap dels tres gens (Figura 5.14).

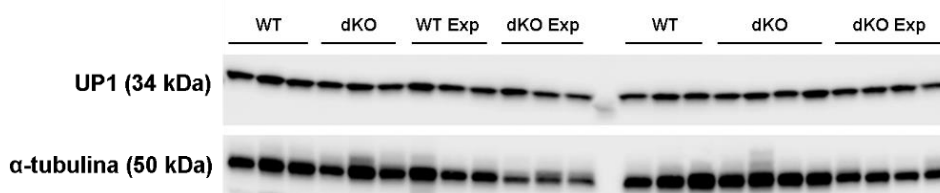


**Figura 5.14. Nivells relatius d'ARNm dels gens *Tymp*, *Upp1* i *Upp2* en ratolins no tractats.** Per cada gen, tots els resultats estan normalitzats pels nivells del gen *Ppia* (ciclofilina A) i es van referir als nivells d'expressió d'un individu del grup WT no exposat. La resta d'animals WT no exposats també es van referir a aquest mateix individu. Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup (WT n=6; WT exposat n=3; dKO n=7; dKO exposat n=10). Els asteriscs representen diferències significatives (\*p<0,05; test U de Mann-Whitney).

En el cas de *Tymp*, els ratolins dKO exposats i no exposats no presentaven ARNm per aquest gen, degut a que la modificació de *Tymp* en el dKO consisteix en una inserció de la seqüència *LoxP* (34 pb) en l'exó 4 del gen, la qual cosa trenca la pauta de lectura, generant un codó stop prematur en una posició que fa l'espècie d'ARNm sigui susceptible a ser degradada pel mecanisme de *nonsense mediated decay* [216].

Pel que fa a *Upp1*, tampoc vam observar diferències entre WT no exposats i WT en els nivells d'ARNm. En els ratolins dKO vam determinar nivells d'ARNm al voltant de 4 vegades superiors als nivells d'animals WT el que indica que, tot i que en la generació del dKO del gen *Upp1* es va interrompre l'expressió del gen entre els exons 4-5, l'ARNm del gen es manté estable. Tot i així, aquest no seria capaç de generar una proteïna funcional, i de fet s'observa que l'activitat TP és negligible en tots els teixits del ratolí dKO. Finalment, l'exposició a nucleòsids tampoc va donar lloc a diferents nivells d'ARN d'*Upp2* entre ratolins no exposats i exposats. Tot i així, sí vam observar un increment significatiu en els nivells d'ARNm d'animal dKO no exposat respecte els WT.

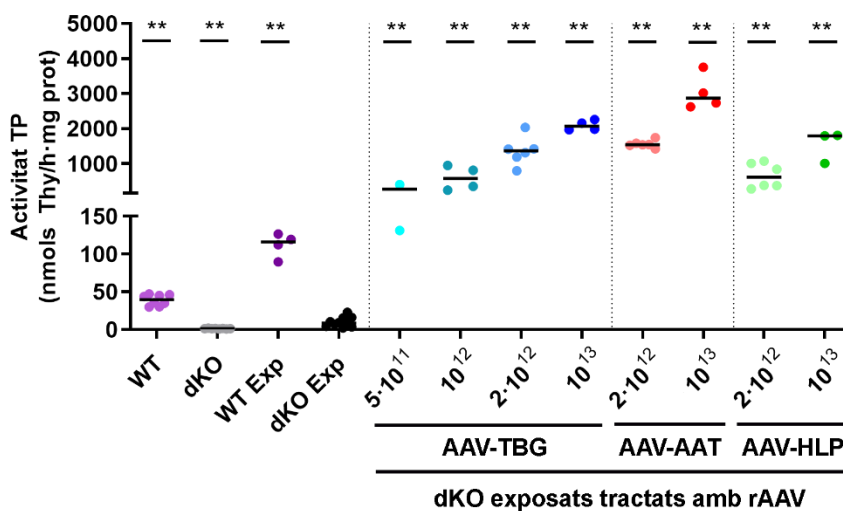
Aquests resultats indiquen que l'increment d'activitat TP que vam observar entre els grups de ratolins exposats i no exposats no es deu a una major síntesi o una estabilització dels ARNm que codifiquen per les 3 proteïnes amb activitat TP.



**Figura 5.15. Detecció d'UP1 i α-tubulina per WB en extractes proteics de fetge de ratolins WT, dKO, WT Exp i dKO Exp.**

En els dKO, l'increment d'activitat TP en fetge amb l'exposició de dThd i dUrd s'ha de deure necessàriament a un increment en la proteïna UP2, i ho vam voler determinar per *western-blot*. Com que no hi ha cap anticòs monoclonal contra UP2 disponible al mercat, i aprofitant que els dKO no presenten UP1, vam utilitzar l'anticòs comercial *ab184613* (*Abcam*) contra UP1 (ja que la homologia entre UP1 i UP2 és del 64%, i hi ha regions amb un 100% d'homologia). No obstant, aquest anticòs no era específic ja que vam

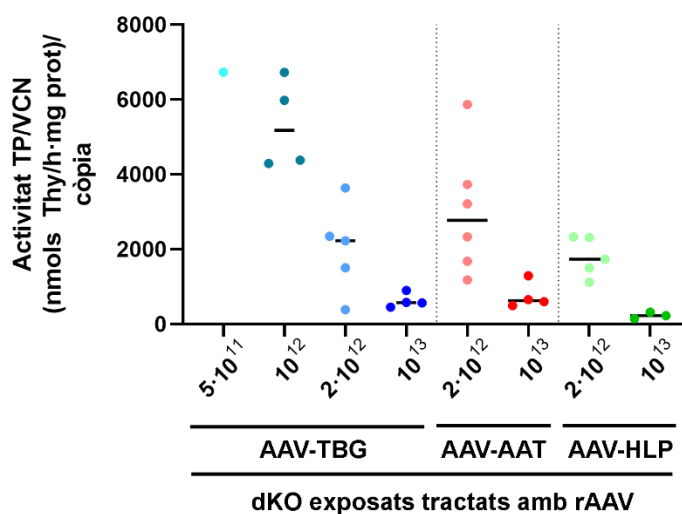
observar banda en tots els grups, incloent-hi els dKO no exposats (**Figura 5.15**) sense diferències en la quantificació per densitometria.



**Figura 5.16. Activitat TP en fetge.** Valors d'activitat TP en fetge de ratolins WT ( $n=8$ ), dKO ( $n=8$ ), WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals indiquen la mediana de l'activitat de cada grup. Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte al grup de dKO exposats (\*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

Posteriorment, vam determinar l'activitat TP en fetge als ratolins tractats amb els diferents rAAVs. Vam veure que, en tots els casos, el tractament amb rAAV va proporcionar una activitat TP al fetge més alta que la dels ratolins WT (**Figura 5.16**), i a la dosi més alta ( $10^{13}$  vg/kg) va arribar a valors entre 40 i 75 vegades més alts comparats amb els valors dels WT. Concretament, els ratolins tractats amb l'AAV-TBG a la dosi de  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg va donar lloc a una activitat TP de  $268 \pm 192$  nmols Thy/h-mg prot (6,7 vegades superior a la dels WT). L'activitat TP en fetge augmentava de manera dosi dependent, de manera que per la dosi més alta ( $10^{13}$  vg/kg) vam obtenir uns valors d'activitat TP de  $2091 \pm 140$  nmols Thy/h-mg prot. L'administració del vector AAV-HLP també va donar lloc a increments importants d'activitat. Tot i així, en aquest cas, els valors d'activitat TP obtinguts en fetge van ser més baixos que els obtinguts amb el AAV-TBG ( $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg:  $658 \pm 354$  nmols Thy/h-mg prot;  $10^{13}$  vg/kg:  $1.535 \pm 456$  nmols Thy/h-mg prot) (**Figura 5.16**). Per contra, l'administració del vector AAV-AAT va resultar en el major increment

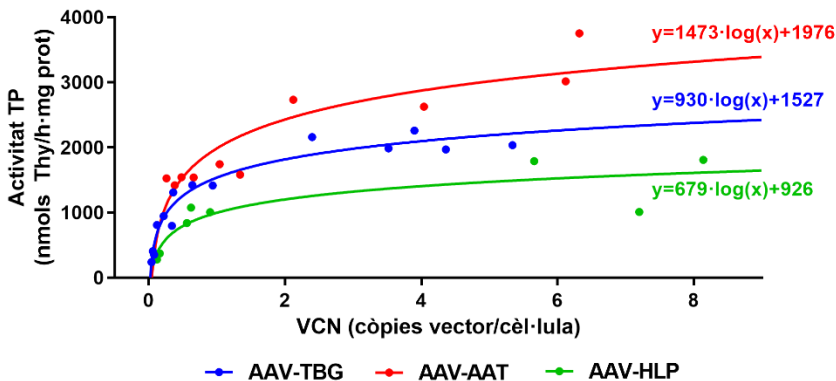
d'activitat TP en fetge observat a les dues dosis estudiades ( $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg:  $1.535 \pm 456$  nmols Thy/h·mg prot;  $10^{13}$  vg/kg:  $3.031 \pm 508$  nmols Thy/h·mg prot) (**Figura 5.16**).



**Figura 5.17. Valors d'activitat TP normalitzats pel VCN en fetge.** Valor d'activitat TP dividit pel valor de VCN en fetge de ratolins dKO exposats tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=1$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals indiquen la mediana de l'activitat de cada grup.

Per a determinar la potència dels promotors i poder-los comparar entre ells vam normalitzar el valor d'activitat TP entre el VCN, i vam determinar que aquest valor no era constant per cada vector sinó que disminuïa a mesura que augmentava la dosi i el número de còpies. En el cas dels ratolins tractats amb el vector AAV-TBG, a la dosi més baixa vam obtenir una valor de 6.733 unitats d'activitat per número de còpies de vector (en aquesta dosi només vam tenir un punt degut a que se'ns va acabar la mostra de fetge), i a la dosi més alta ( $10^{13}$  vg/kg) valors d'entre 451-899 unitats d'activitat per còpia (**Figura 5.17**). D'igual manera, l'administració amb el vector AAV-AAT també va donar lloc a valors d'activitat TP normalitzats per VCN que disminuïen amb la dosi ( $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg: 1.179-5.866 unitats d'activitat per còpia;  $10^{13}$  492-1.288 unitats d'activitat per còpia) (**Figura 5.17**). Finalment, en els ratolins tractats amb el vector AAV-HLP també vam observar com el ràtio entre activitat TP i VCN disminuïa amb la dosi ( $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg: 1.117-2.331 unitats d'activitat per còpia;  $10^{13}$  140-316 unitats d'activitat per còpia) (**Figura 5.17**).

El vector on es van observar valors més alts d'activitat TP normalitzada per VCN va ser el vector AAV-AAT en les dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg i  $10^{13}$  vg/kg que són les dosis comuns entre els tres rAAV (**Figura 5.17**).



**Figura 5.18. Comparativa de l'eficiència de cada vector.** Representació XY de l'activitat TP en fetge per VCN. En blau estan els valors de l'AAV-TBG, en vermell els de l'AAV-AAT, i en verd de l'AAV-HLP. Cada sèrie de valors s'ha ajustat a una corba semilogarítmica ( $Y = \text{pendent} \cdot \log(x) + \text{intercepció}$ ).

El fet que el ràtio de l'activitat TP entre el VCN no sigui constant, sinó que disminueixi a mesura que augmenta el VCN fa que sigui complicat comparar els vectors entre ells. No obstant, quan vam fer una representació XY del VCN i l'activitat TP en fetge dels 3 vectors (**Figura 5.18**) vam observar que l'AAV-AAT va ser el vector que presentava els valors més alts. La distribució dels punts d'activitat TP vs el VCN s'ajustava a una funció no lineal:

$$Y = \text{pendent} \cdot \log(X) + \text{intercepció}$$

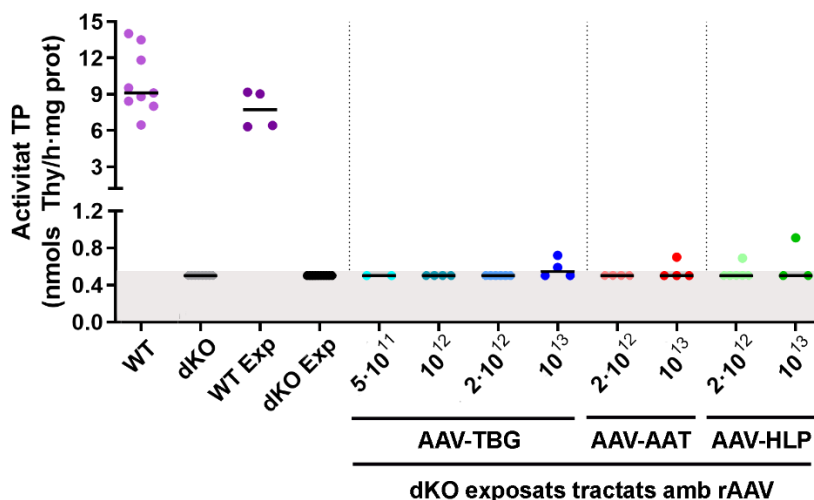
on la **Y** és l'activitat TP i la **X** el VCN. En fer una transformació semilogarítmica de les dades, vam observar que l'AAV-AAT és el vector que presentava una pendent més alta ( $p < 0,05$ ; test F suma extra de quadrats).

### 5.1.6. ACTIVITAT TP EN TEIXITS NO HEPÀTICS

Tant pel promotor com pel tropisme, el vector està dissenyat de manera que expressi la TP de forma específica al fetge. Tot i així vam avaluar l'activitat TP en cervell, múscul esquelètic i intestí prim per veure si el vector va provocar una expressió de TP en teixits no desitjats, tal i com ja s'havia observat prèviament al nostre laboratori [100].

### 5.1.6.1. Cervell

A diferència del que vam observar en fetge, l'exposició als nucleòsids no incrementava els valors d'activitat TP en cervell en ratolins WT, que de manera natural són més baixos que al fetge (WT exposat:  $7,7 \pm 1,6$  nmols Thy/h·mg prot; WT no exposat:  $10,0 \pm 2,6$  nmols Thy/h·mg prot). En ratolins dKO, tant exposats com no, els valors d'activitat TP del cervell van ser indetectables (per sota de 0,5 nmols Thy/h·mg prot) i en la majoria dels ratolins dKO tractats amb rAAVs (30/35 animals), l'activitat TP en cervell seguia sent indetectable. Tot i així, 5 ratolins (2 tractats amb l'AAV-TBG dosi  $10^{13}$  vg/kg, 1 tractat amb AAV-AAT dosi  $10^{13}$  vg/kg, 1 tractat amb l'AAV-HLP dosi  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg i 1 tractat amb l'AAV-HLP dosi  $10^{13}$  vg/kg) van desenvolupar una activitat TP detectable en cervell (0,6 - 0,9 nmols Thy/h·mg prot), en tots els casos per sota dels valors d'animals WT (Figura 5.19).

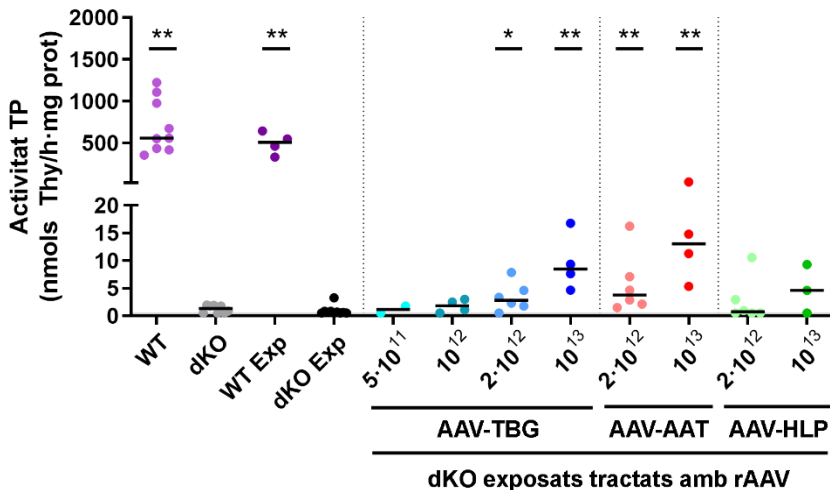


**Figura 5.19. Activitat TP en cervell.** Valors d'activitat TP en cervell de ratolins WT ( $n=9$ ), dKO ( $n=8$ ), WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals indiquen la mediana de l'activitat de cada grup. La regió ombrejada en gris indica el límit de quantificació de la determinació d'activitat TP ( $< 0,5$  nmols Thy/h·mg prot).

En els ratolins dKO tractats amb rAAV que presentaven una activitat TP detectable en cervell vam intentar determinar si aquesta activitat es devia a una transducció del cervell residual per part del vector. No obstant, per qPCR no vam detectar la presència del genoma del vector ni l'expressió de *TYMP* en forma d'ARNm provinent del vector.

### 5.1.6.2. Intestí prim

Tal i com s'havia vist anteriorment [98,100], l'intestí prim va ser un dels teixits més rics en activitat TP en animals WT ( $700 \pm 322$  nmols Thy/h·mg prot) mentre que el model de ratolí dKO pràcticament no presentava activitat TP (dKO:  $1,2 \pm 0,7$  nmols Thy/h·mg prot; màxim 2,0 nmols Thy/h·mg prot).



**Figura 5.20. Activitat TP en intestí prim.** Valors d'activitat TP en intestí prim de ratolins WT (n=9), dKO (n=8), WT exposats (WT Exp) (n=4) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) (n=10) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg (n=2),  $10^{12}$  vg/kg (n=4),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i  $10^{13}$  vg/kg (n=4); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i  $10^{13}$  vg/kg (n=4); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i  $10^{13}$  vg/kg (n=3)). Les línies horitzontals indiquen la mediana de l'activitat de cada grup. Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte al grup de dKO exposats (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

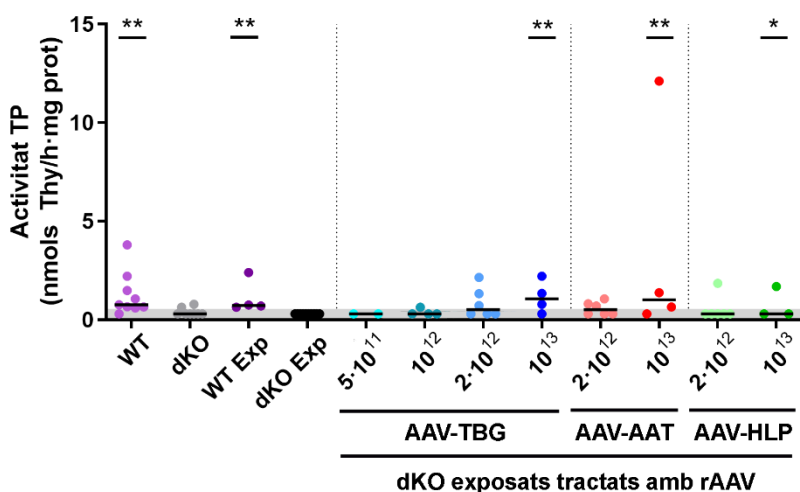
L'exposició a nucleòsids a la beguda tampoc va provocar un increment en l'activitat TP en l'intestí prim de ratolins WT ( $495 \pm 133$  nmols Thy/h·mg prot) ni dKO ( $0,9 \pm 0,8$  nmols Thy/h·mg prot) (Figura 5.20).

El tractament amb rAAV va provocar un increment en l'activitat TP en intestí prim per sobre el rang dels dKO en el 46% (16/35) dels casos, tot i que en cap ratolí es va arribar a recuperar els valors d'activitat TP de ratolins WT. Concretament, el vector AAV-AAT va ser el que va produir el major increment d'activitat TP en intestí prim (32,9 nmols Thy/h·mg prot en un ratolí tractat amb la dosi de  $10^{13}$  vg/kg; un 5% de l'activitat TP en intestí dels animals WT), i es va observar una dosi dependència (Figura 5.20).

En aquest cas tampoc vam detectar el genoma del vector en aquells ratolins que presentaven una activitat TP superior a la del rang els dKO. No obstant, sí que vam detectar expressió del transgèn en forma d'ARNm en algun cas puntual, tot i que no de manera consistent amb aquell que presentava una activitat TP major.

### 5.1.6.3. Múscul esquelètic

El múscul esquelètic (gastrocnemi) de ratolins WT va presentar una activitat TP molt baixa  $1,3 \pm 1,1$  nmols Thy/h·mg prot), i l'exposició a nucleòsids tampoc la va incrementar ( $1,1 \pm 0,8$  nmols Thy/h·mg prot). En el model dKO, tant en ratolins exposats com en ratolins no exposats, trobem valors d'activitat TP indetectables (excepte en 2 animals dKO) (**Figura 5.21**).



**Figura 5.21. Activitat TP en múscul esquelètic.** Valors d'activitat TP en gastrocnemi de ratolins WT (n=9), dKO (n=8), WT exposats (WT Exp) (n=4) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) (n=10) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg (n=2),  $10^{12}$  vg/kg (n=4),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i  $10^{13}$  vg/kg (n=4); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i  $10^{13}$  vg/kg (n=4); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg (n=6) i  $10^{13}$  vg/kg (n=3)). Les línies horitzontals indiquen la mediana de l'activitat de cada grup. La regió ombrejada en gris indica el límit de quantificació d'activitat TP (<0,5 nmols Thy/h·mg prot).

En el 57% ratolins dKO tractats amb AAV (20/35 animals), l'activitat TP en múscul esquelètic continuava sent indetectable després dels tractament amb rAAV. En el 29% (10/35) dels ratolins dKO tractats (2 tractats amb l'AAV-TBG dosi  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg; 2 tractats amb l'AAV-TBG dosi  $10^{13}$  vg/kg, 2 tractats amb AAV-AAT dosi  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg, 2 tractats



amb AAV-AAT dosi  $10^{13}$  vg/kg, 1 tractats amb l'AAV-HLP dosi  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg i 1 tractats amb l'AAV-HLP dosi  $10^{13}$  vg/kg) vam obtenir una activitat TP per sobre valor màxim dels ratolins dKO en múscul esquelètic, i en 1 cas puntual (1 animal tractat amb el vector AAV-AAT a la dosi  $10^{13}$  vg/kg) l'activitat TP va arribar a superar la dels animals WT (**Figura 5.21**).

En aquests animals tampoc vam detectar el vector en aquests ratolins en forma d'ADN (vector), però igual que en el cas de l'intestí prim, sí que en algun cas puntual vam detectar presència d'ARNm del vector, sense que correlacionés amb aquell animal que tenia una activitat TP més alta.

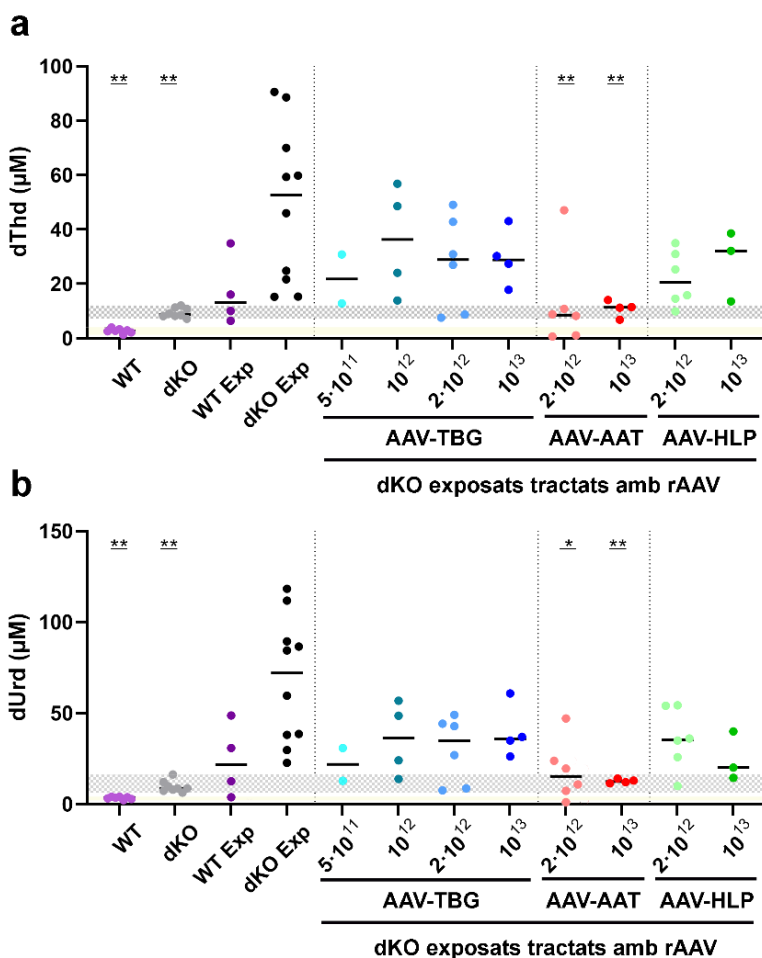
## 5.1.7. CONTINGUT DE NUCLEÒSIDS EN TEIXITS AL FINAL DE L'ESTUDI

### 5.1.7.1. Concentració de dThd i dUrd en plasma

Al final de l'estudi, vam mesurar els nucleòsids en una mostra de sang al moment just posterior al sacrifici per punció intracardíaca, a diferència dels diferents punts del seguiment durant la vida dels animals, on s'obtenia la sang a partir de la vena safena (**Figura 5.22**).

De manera similar al que havíem observat en el seguiment dels nucleòsids en plasma a diferents temps, en els animals WT l'exposició crònica a dThd i dUrd va provocar en un increment en les seves concentracions plasmàtiques (dThd:  $16,8 \mu\text{M} \pm 12,7 \mu\text{M}$ ; dUrd:  $24,0 \pm 20,0 \mu\text{M}$ ) respecte els WT no exposats (dThd:  $2,7 \mu\text{M} \pm 0,9 \mu\text{M}$ ; dUrd:  $3,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) tot i que aquesta diferència no va ser significativa. En el cas dels animals dKO, l'exposició va induir una concentració plasmàtica significativament superior al valor dels animals dKO no exposats ( $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney) i també superior al valor dels ratolins WT no exposats ( $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney) (**Figura 5.22**).

En els diversos grups de ratolins tractats amb rAAV vam observar concentracions de nucleòsids en plasma variables, que presentaven una dispersió en els valors similar a l'observada en el seguiment dels nucleòsids en plasma durant les primeres 40 setmanes, en alguns casos amb valors de concentració dins del rang de concentracions plasmàtiques dels dKO, altres en el rang dels WT i alguns inclús inferiors. Tot i així, el tractament amb les dues dosis del vector AAT va aconseguir reduccions que resultaven estadísticament significatives respecte els dKO exposats (**Figura 5.22**).

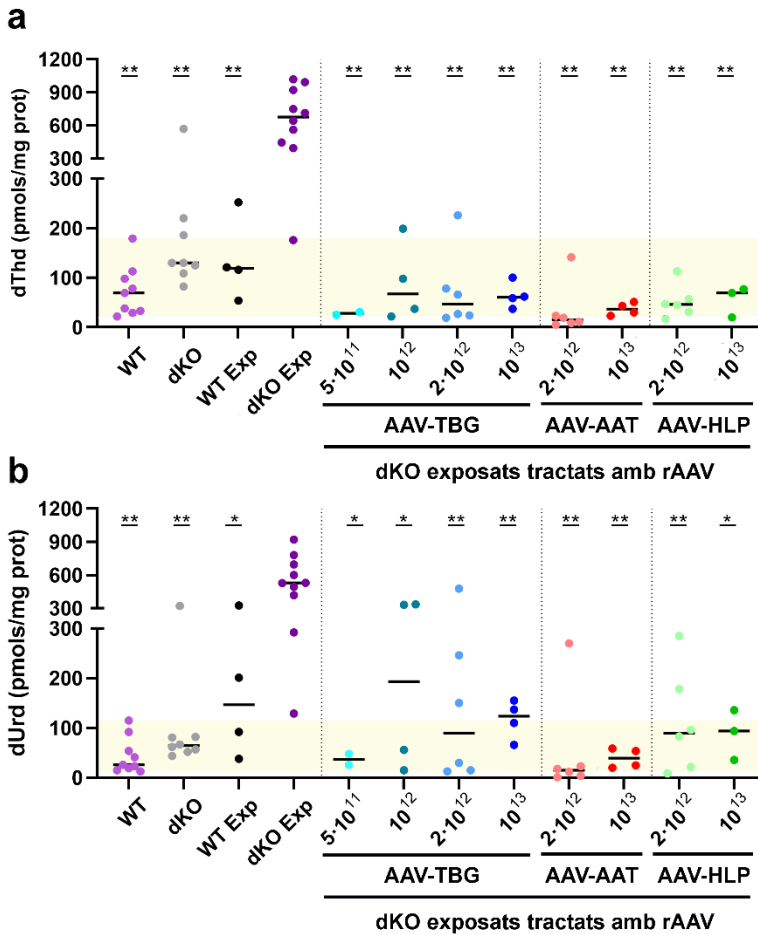


**Figura 5.22. Concentració de dThd i dUrd en plasma en ratolins.** Concentració de **a)** dThd i **b)** de dUrd en plasma en ratolins WT (n=7), dKO (n=8), WT exposats (WT Exp) (n=4) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) (n=10) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG: 5·10<sup>11</sup> vg/kg (n=2), 10<sup>12</sup> vg/kg (n=4), 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=4); AAV-AAT: 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=4); AAV-HLP 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=3)). Les línies horitzontals representen la mediana. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives amb el grup de dKO exposat (\*p<0,05; \*\*p<0,01; test U de Mann-Whitney). La zona ombrejada en groc indica el rang de concentracions dels WT i la zona en gris el rang dels dKO.

### 5.1.7.2. Contingut de dThd i dUrd en fetge

La quantitat de nucleòsids en fetge d'animals dKO va ser entre 2 i 3 vegades superior a la dels animals WT (dThd<sub>dKO</sub> = 194 ± 157 pmols/mg prot vs. dThd<sub>WT</sub> = 73 ± 51 pmols/mg prot; dUrd<sub>dKO</sub> = 96 ± 92 pmols/mg prot vs. dUrd<sub>WT</sub> = 44 ± 36 pmols/mg prot), mentre que l'exposició a nucleòsids va incrementar la quantitat de nucleòsids en fetge entre 2 i 4 vegades en animals WT (dThd: 136 ± 83 pmols/mg prot; dUrd 164 ± 127 pmols/mg prot)

i entre 9 i 12 vegades en animals dKO (dThd:  $661 \pm 275$  pmols/mg prot; dUrd  $539 \pm 231$  pmols/mg prot) (**Figura 5.23**).



**Figura 5.23. Contingut de dThd i dUrd en fetge.** Contingut de **a**) dThd i **b**) de dUrd en ratolins WT ( $n=9$ ), dKO ( $n=8$ ), WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals representen la mediana. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives amb el grup de dKO exposat (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; test U de Mann-Whitney). La zona ombrejada en groc indica el rang de contingut del nucleòsid en els WT.

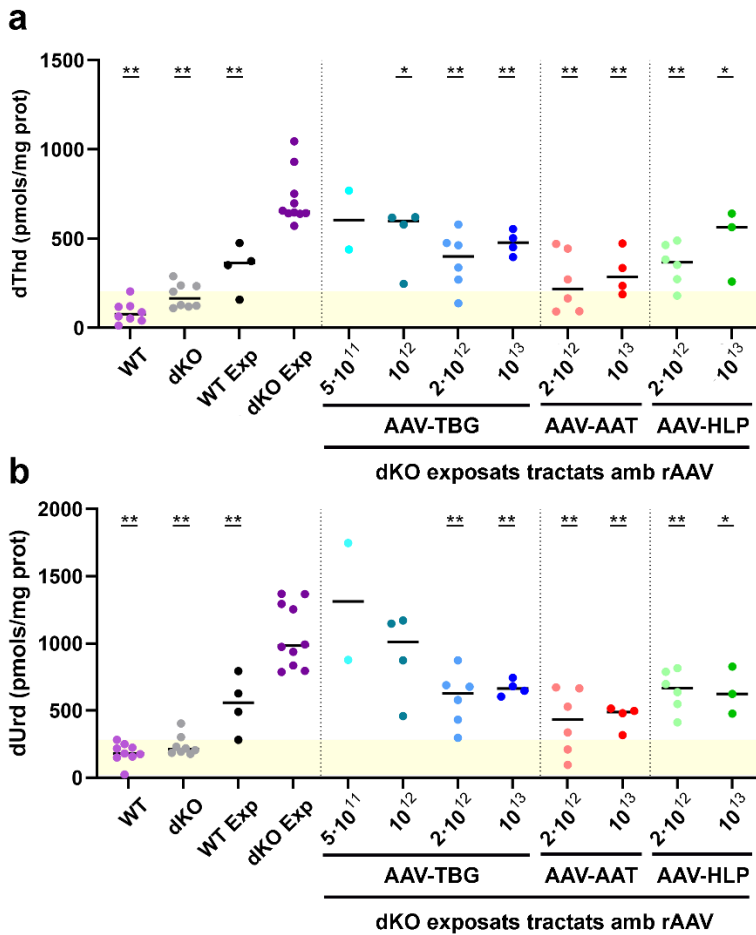
El tractament amb el vector AAV-TBG va reduir la quantitat de dThd i dUrd en la majoria de casos a valors dins del rang dels animals WT (en 14 de 16 ratolins per la dThd i en 6 de 16 per la dUrd), independentment de la dosi. En el cas dels ratolins tractats amb el vector AAV-AAT, vam observar una correcció del contingut de dThd en tots els animals en el cas de la dThd, i en 9 de 10 animals per la dUrd. Finalment, dels ratolins tractats

amb el vector AAV-HLP, els 9 de 9 ratolins recuperaven el contingut hepàtic de dThd i 6 de 9 recuperaven el contingut hepàtic de dUrd. Quan comparem els diversos vectors, s'observa que el vector AAV-AAT és el que va obtenir les reduccions més grans de la quantitat de dThd i dUrd.

### 5.1.7.3. Contingut de dThd i dUrd en cervell

El contingut de nucleòsids en cervell de ratolins dKO no exposats va ser de mitjana 2 vegades superior a la dels animals WT (dThd<sub>dKO</sub> = 181 ± 69 pmols/mg prot vs. dThd<sub>WT</sub> = 88 ± 60 pmols/mg prot; dUrd<sub>dKO</sub> = 240 ± 77 pmols/mg prot vs. dUrd<sub>WT</sub> = 185 ± 74 pmols/mg prot). L'exposició a nucleòsids va provocar un increment de la quantitat de nucleòsids en cervell entre 3 i 4 vegades en animals WT (dThd: 340 ± 133 pmols/mg prot; dUrd 549 ± 217 pmols/mg prot) i entre 6 i 8 vegades en animals dKO (dThd: 549 ± 217 pmols/mg prot; dUrd 1.061 ± 237 pmols/mg prot) (**Figura 5.24**).

El tractament amb les diferents dosis del vector AAV-TBG només va reduir la quantitat de dThd en cervell fins a valors WT en 1 de 16 animals (2·10<sup>12</sup> vg/kg). No obstant en el cas de les dues dosis més altes (2·10<sup>12</sup> i 10<sup>13</sup> vg/kg) hi ha haver una reducció significativa respecte els dKO exposats (p<0,01; test U de Mann-Whitney), que va arribar a quantitats de nucleòsids de cervell dins del rang dels WT exposats. En el cas dels ratolins tractats amb el vector AAV-AAT, vam observar una correcció del contingut de dThd fins a valors WT en 4 de 10 ratolins i de dUrd en 3 de 10 ratolins, i de manera general, les dues dosis van reduir significativament els nucleòsids (p<0,01 test U de Mann Whitney) respecte els valors dels ratolins dKO exposats. Finalment, el tractament amb el vector AAV-HLP tot i que només va reduir la quantitat de dThd en cervell en 1 de 10 ratolins valors dins del rang WT, també va disminuir la quantitat de dThd en cervell de manera significativa respecte els dKO exposats (dosi de 2·10<sup>12</sup> vg/kg: p<0,01 test U de Mann Whitney; dosi de 10<sup>13</sup> vg/kg: p<0,05 test U de Mann Whitney) i es va recuperar el contingut cerebral de dThd i dUrd fins a valors similars als dels WT exposats. Si comparem els vectors entre ells, s'observa que el vector AAV-AAT també és el que va produir una major reducció de la quantitat de nucleòsids en cervell, com en fetge i en plasma.

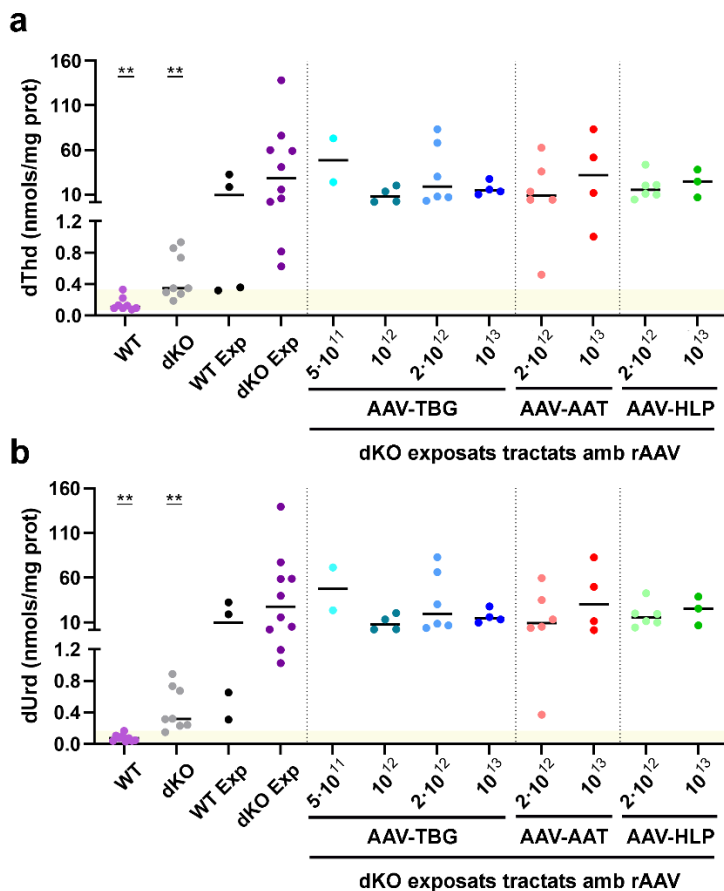


**Figura 5.24. Contingut de dThd i dUrd en cervell.** Contingut de **a)** dThd i **b)** de dUrd en ratolins WT ( $n=7$ ) i dKO ( $n=8$ ) no exposats, WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i de  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals representen la mediana. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives amb el grup de dKO exposat (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney). La zona ombrejada en groc indica el rang de concentracions dels WT.

#### 5.1.7.4. Contingut de dThd i dUrd en intestí prim

El contingut de nucleòsids en l'intestí prim d'animals dKO es va situar a valors entre 3 i 6 vegades superior a la dels animals WT ( $dThd_{dKO} = 0,44 \pm 0,28$  nmols/mg prot vs.  $dThd_{WT} = 0,15 \pm 0,09$  nmols/mg prot;  $[dUrd]_{dKO} = 0,50 \pm 0,30$  nmols/mg prot vs.  $dUrd_{WT} = 0,08 \pm 0,04$  pmols/mg prot). En aquest cas, l'exposició a nucleòsids va resultar en un increment mitjà de 90 vegades la quantitat de dThd i de 160 vegades la quantitat de dUrd en ratolins WT ( $dThd_{12,8 \pm 15,5}$  nmols dThd/mg prot i  $13,0 \pm 15,5$  nmols dUrd/mg prot) i entre 265

i 500 vegades en ratolins dKO exposats (dThd  $39,7 \pm 44,8$  nmols dThd/mg prot i  $39,9 \pm 45,0$  nmols dUrd/mg prot) (**Figura 5.25**). El tractament amb els diferents rAAVs no va produir la reducció del contingut de nucleòsids a l'intestí prim.



**Figura 5.25. Contingut de dThd i dUrd en intestí prim.** Contingut de **a)** dThd i **b)** de dUrd en ratolins WT ( $n=7$ ) i dKO ( $n=8$ ) no exposats, WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals representen la mediana. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives amb el grup de dKO exposat (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney). La zona ombrejada en groc indica el rang de concentracions dels WT.

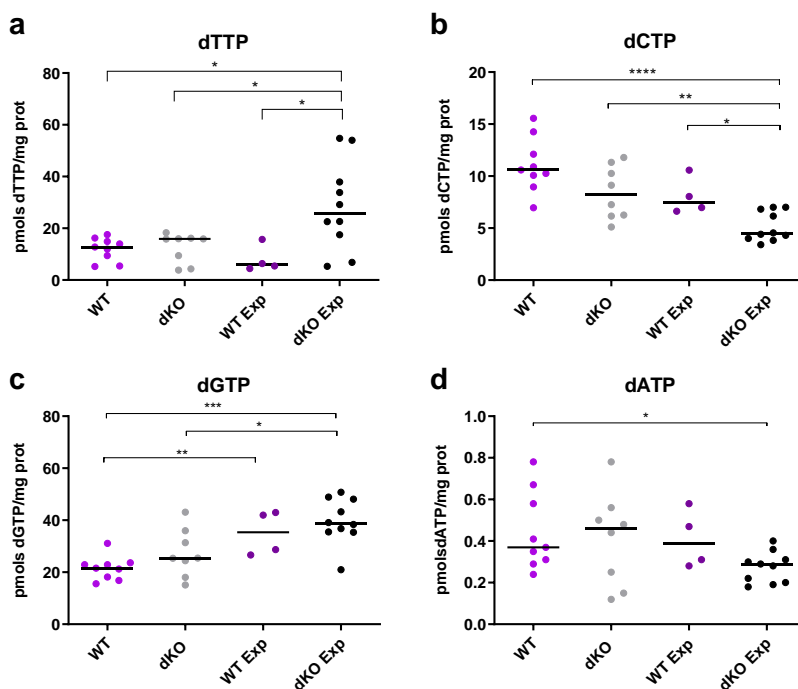
## 5.1.8. CONTINGUT DE dNTPS MITOCONDRIALS

### 5.1.8.1. Fetge

Per a determinar com afecten els canvis en el contingut de nucleòsids al *pool* de dNTPs mitocondrials vam determinar el contingut de dTTP, dCTP, dGTP i dATP en mitocondris de fetge.

Tot i que no vam observar diferències entre el contingut de dTTP mitocondrial en fetge de ratolins WT i ratolins dKO, sí que vam observar que l'exposició a nucleòsids produïa un increment de la quantitat de dTTP mitocondrial en fetge de ratolins dKO. En canvi, l'exposició a nucleòsids en ratolins WT no va resultar en un increment dels valors de dTTP (**Figura 5.26a**). En el cas del dCTP, la quantitat en ratolins dKO va resultar lleugerament inferior que en els ratolins WT, tot i que aquesta reducció no va ser significativa. L'exposició a nucleòsids va provocar una reducció del contingut de dCTP en fetge respecte els ratolins WT no exposats, WT exposats i dKO no exposats (**Figura 5.26b**). De fet, l'augment de dTTP i disminució de dCTP són conseqüències de la sobrecàrrega de dThd ja observades anteriorment [63]. Pel que fa als nucleòtids de purines, l'exposició a dThd i dUrd va provocar un increment en la concentració de dGTP mitocondrial en ratolins WT i en dKO. Finalment, els ratolins dKO exposats també van mostrar una disminució significativa de dATP comparat amb els ratolins WT no exposats (**Figura 5.26c-d**).

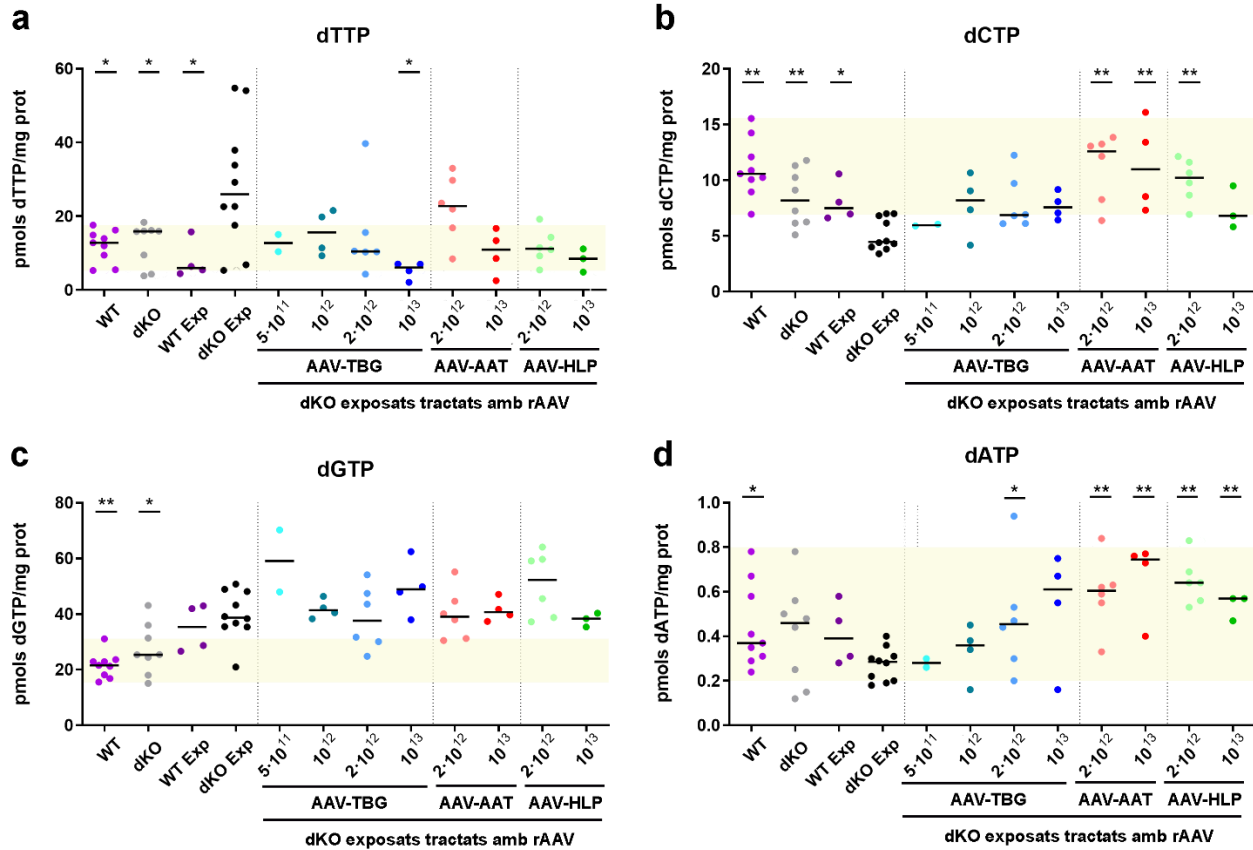
El tractament amb l'AAV-TBG va prevenir l'increment del dTTP en 13 de 16 ratolins dKO exposats. Tot i així, degut a l'alta dispersió dels valors obtinguts en ratolins dKO exposats sense tractar, només vam observar diferències estadísticament significatives amb el grup de ratolins tractats a la dosi de  $10^{13}$  vg/kg, que produïa la major reducció de dTTP (**Figura 5.27a**). De manera anàloga, el tractament amb AAV-TBG va aconseguir recuperar el contingut de dCTP present en els ratolins WT en 10 de 16 ratolins, tot i que en cap de les dosis es van detectar diferències estadísticament significatives respecte als dKO exposats no tractats (**Figura 5.27b**). El contingut de dGTP mitocondrial no van canviar en els ratolins tractats amb les diverses dosis de l'AAV-TBG. En canvi, el contingut de dATP mitocondrial va semblar que augmentava de manera dosi dependent i en el cas de la dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg aquest augment va ser significatiu ( $p < 0,05$  test U de Mann Whitney) (**Figura 5.27c-d**).



**Figura 5.26. Contingut de dNTPs mitocondrials en fetge de ratolins no tractats.** Contingut mitocondrial de **a**) timidina trifosfat (dTTP), **b**) desoxicitidina trifosfat (dCTP), **c**) desoxiguanosina trifosfat (dGTP) i **d**) desoxiadenosina trifosfat (dATP) en fetge de ratolins WT ( $n=9$ ) i dKO ( $n=8$ ) no exposats, WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats (dKO Exp) ( $n=10$ ). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup. Els asteriscs indiquen diferències significatives comparades amb el grup de ratolins dKO exposats a dThd i dUrd. (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$  test U de Mann-Whitney).

Tant el tractament amb el vector AAV-AAT com amb el vector AAV-HLP van reduir la quantitat de dTTP en animals dKO exposats. El tractament amb l'AAV-AAT a la dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg només va reduir el contingut de dTTP a valors WT en 2/6 animals, en canvi amb a la dosi més alta es va reduir el contingut de dTTP a nivells de ratolins WT en tots els animals. Pel que fa al AAV-HLP, el 89% del ratolins (8/9) tractats amb aquest vector van mostrar quantitats de dTTP mitocondrial a nivells de WT (**Figura 5.27a**). La depleció de dCTP observada en els ratolins dKO exposats també es va prevenir amb el tractament amb les dues dosis del vector AAV-AAT i en la dosi de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg del vector AAV-HLP (excepte en la dosi més alta de. En el cas de l'AAV-ATT, el 90% dels animals (9/10) van recuperar el contingut de dCTP de ratolins WT, mentre que amb l'AAV-HLP el 89% (8/9) (**Figura 5.27b**).



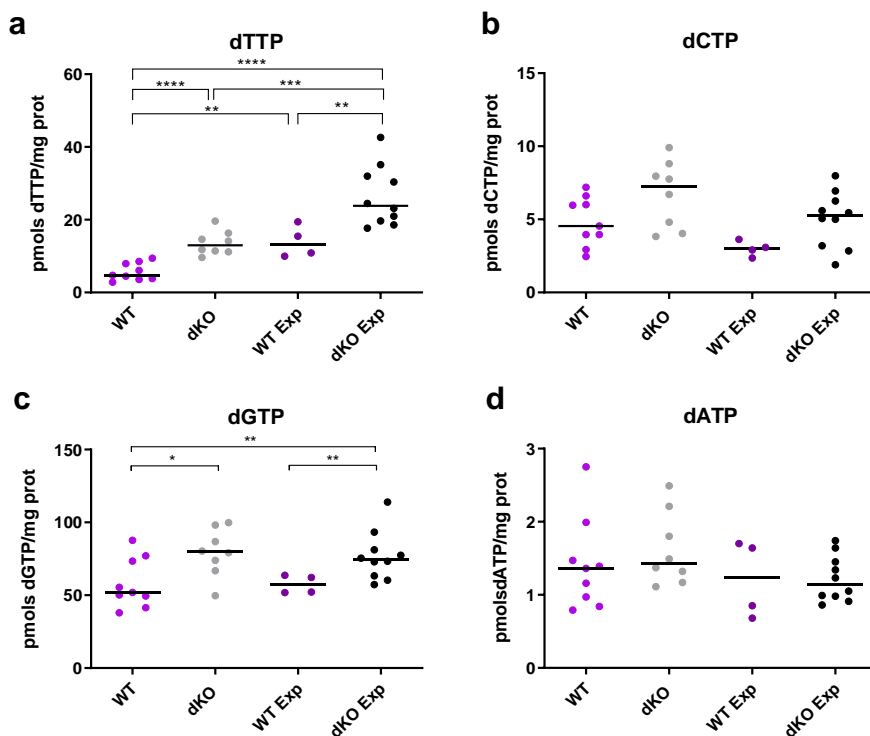


**Figura 5.27. Contingut de dNTPs mitocondrials en fetge.** Contingut mitocondrial de **a**) timidina trifosfat (dTTP), **b**) desoxicitidina trifosfat (dCTP), **c**) desoxiguanosina trifosfat (dGTP) i **d**) desoxiadenosina trifosfat (dATP) en fetge de ratolins WT (n=9) i dKO (n=8) no exposats, WT exposats (WT Exp) (n=4) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) (n=10) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG: dosis de 5·10<sup>11</sup> vg/kg (n=2), 10<sup>12</sup> vg/kg (n=4), 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=4); AAV-AAT: dosis de 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=4); AAV-HLP: dosis de 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=3)). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup. L'àrea ombrada en groc indica el rang del contingut de cadascun dels dNTPs en ratolins WT. Els asteriscs indiquen diferències significatives comparades amb el grup de ratolins dKO exposats a dThd i dUrd. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; test U de Mann-Whitney).

Finalment, els tractaments amb els vectors AAV-AAT i AAV-HLP van produir augments significatius del contingut de dATP mitocondrial en fetge, mentre que no van afectar a la quantitat de dGTP mitocondrial en els ratolins dKO exposats (**Figura 5.27c-d**).

Quan vam correlacionar la quantitat de nucleòsids en fetge amb el contingut de dNTPs en fetge vam observar que el contingut de dThd correlacionava negativament amb el contingut de dCTP ( $p < 0,0001$ ; correlació de Pearson), però no amb el contingut de dTTP, ni el contingut de dTTP i dCTP entre ells.

### 5.1.8.2. Cervell



**Figura 5.28. Contingut de dNTPs mitocondrials en cervell de ratolins no tractats.** Contingut mitocondrial de **a**) timidina trifosfat (dTTP), **b**) desoxicitidina trifosfat (dCTP), **c**) desoxiguanosina trifosfat (dGTP) i **d**) desoxiadenosina trifosfat (dATP) en fetge de ratolins (WT (n=9) i dKO (n=8) no exposats, WT exposats (WT Exp) (n=4) i dKO exposats (dKO Exp) (n=10). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup. Els asteriscs indiquen diferències significatives comparades amb el grup de ratolins dKO exposats a dThd i dUrd. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test U de Mann-Whitney).

També vam determinar el contingut de dTTP, dCTP, dGTP i dATP en mitocondris de cervell per a veure si els desequilibris observats a nivell de nucleòsids, també es traduïen a nivell de dNTPs mitocondrials en aquest teixit.

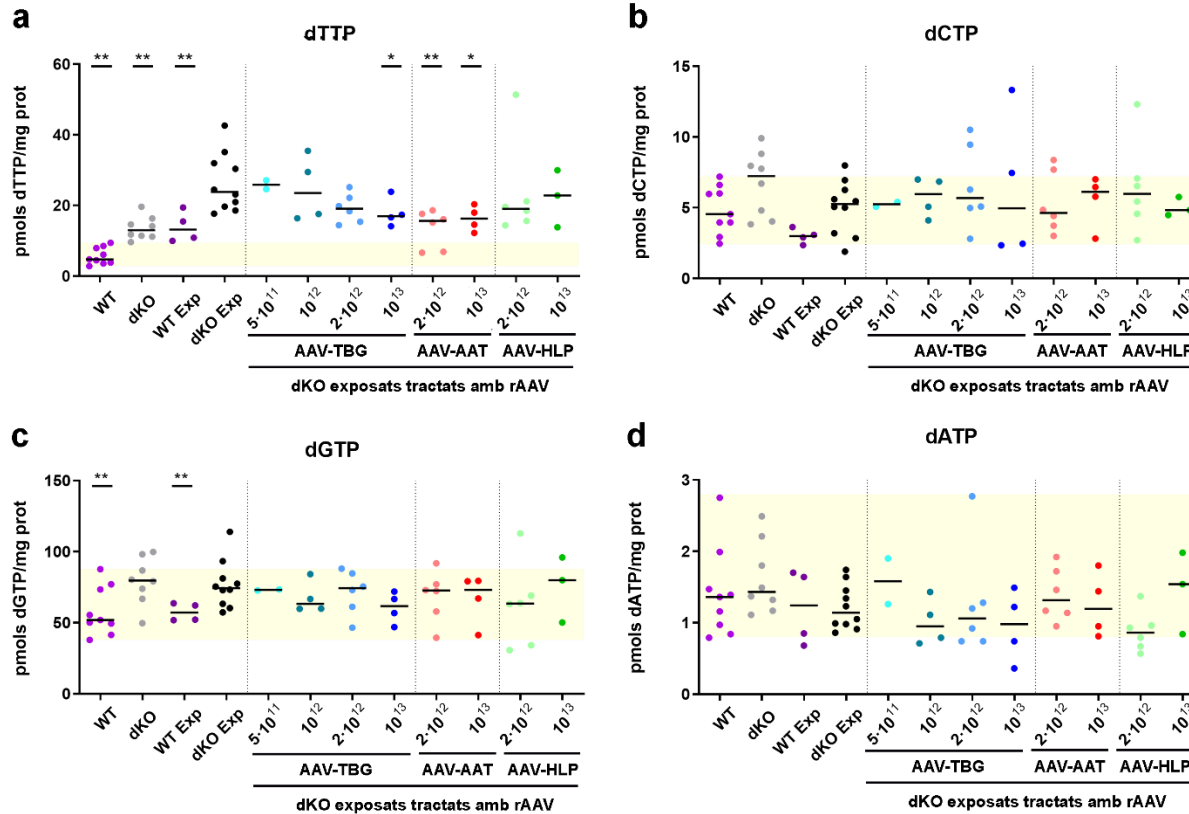
El contingut de dTTP en cervell de ratolins dKO va ser més elevada que en els ratolins WT. A més, l'exposició a nucleòsids va provocar un increment de la concentració de dTTP en mitocondris de cervell tan en els ratolins dKO ( $26,5 \pm 8,3$  pmols dTTP/mg prot; rang: 17,7 - 42,6) respecte els dKO no exposats ( $13,6 \pm 3,3$  pmols dTTP/mg prot; rang: 9,6 - 19,6), com en ratolins WT ( $13,9 \pm 4,4$  pmols dTTP/mg prot; rang: 10,0 - 19,4) respecte els WT no exposats ( $5,7 \pm 2,4$  pmols dTTP/mg prot; rang: 2,8 - 9,4) (**Figura 5.28a**). No obstant, l'exposició a nucleòsids no va provocar diferències en el contingut de dCTP en mitocondris de cervell ni degudes al genotip ni degudes a l'exposició (**Figura 5.28b**).

Pel que fa als nucleòtids de purines, els ratolins dKO presentava una quantitat de dGTP més elevada que els WT ( $p < 0,05$  test U de Mann Whitney). L'exposició a dThd i dUrd no va provocar canvis en el contingut mitocondrial ni de dGTP ni de dATP. (**Figura 5.28c-d**).

En la **Figura 5.29**, es mostra de manera general, el contingut dels quatre dNTPs en mitocondris de cervell en els diversos grups exposats, no exposats i tractats amb AAV.

El tractament amb l'AAV-TBG només va afectar al contingut de dTTP, on va aconseguir reduir la quantitat de dTTP de manera dosi depenent, aconseguint una reducció significativa només a la dosi més alta ( $10^{13}$  vg/kg), però no va afectar a cap dels altres tres dNTPs (**Figura 5.29**).

L'administració de l'AAV-AAT va provocar una reducció significativa el contingut de dTTP en les dues dosis testades ( $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg:  $13,5 \pm 5,4$  pmols dTTP/mg prot; rang 6,6 – 18,6; i  $10^{13}$  vg/kg:  $16,3 \pm 3,6$  pmols dTTP/mg prot; rang 12,2– 20,3) tot i que no arriba a concentracions de dTTP dels ratolins WT. Aquest tractament no va afectar a cap dels altres tres dNTPs (**Figura 5.29**).



**Figura 5.29. Contingut de dNTPs mitocondrials en cervell.** Contingut mitocondrial de **a**) timidina trifosfat (dTTP), **b**) desoxicitidina trifosfat (dCTP), **c**) desoxiguanosina trifosfat (dGTP) i **d**) desoxiadenosina trifosfat (dATP) en cervell de ratolins WT ( $n=9$ ) i dKO ( $n=8$ ) no exposats, WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG: dosis de  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT: dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP: dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup. L'àrea ombrejada en groc indica el rang del contingut de cadascun dels dNTPs en ratolins WT. Els asteriscs indiquen diferències significatives comparades amb el grup de ratolins dKO exposats a dThd i dUrd. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

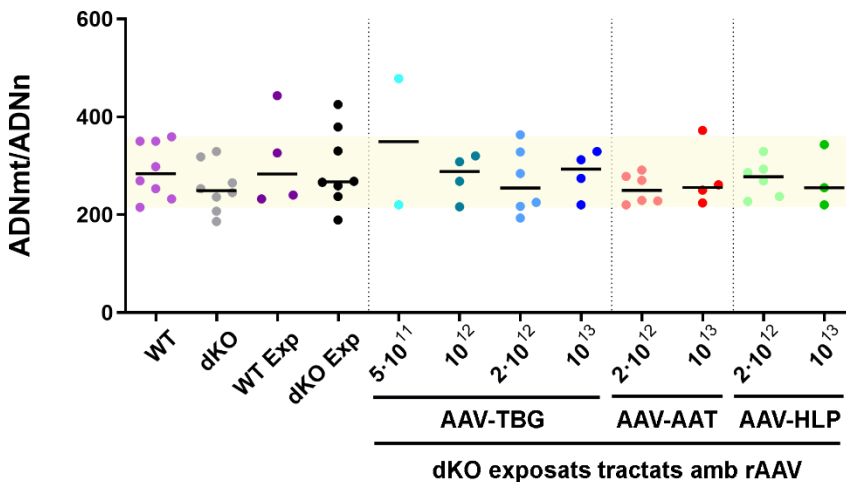
Finalment, el tractament amb l'AAV-HLP no va produir cap efecte sobre les concentracions mitocondrials de cap dels quatre dNTPs (**Figura 5.29**).

En el cas del cervell, vam observar que el contingut de dThd correlacionava amb el contingut de dTTP ( $p < 0,0001$ ; correlació de Pearson) però no amb el dCTP, ni tampoc el contingut de dTTP i dCTP entre ells.

### 5.1.9. NÚMERO DE CÒPIES D'ADNmt

#### 5.1.9.1. Cervell

Als 22 mesos d'edat, no es va observar diferències del número de còpies d'ADNmt en cervell entre els ratolins dKO i els WT (**Figura 5.30**). L'exposició crònica a dThd i dUrd tampoc va provocar depleció de l'ADNmt en WT ni en dKO. De fet, entre els 3 grups de ratolins no tractats que no són WT, només 6/20 ratolins van tenir un valor fora del rang de número de còpies dels ratolins WT (3 ratolins valors superiors, i 3 animals valors inferiors). Cap dels tractaments amb rAAV en els dKO exposats va conduir ni a un increment ni a una depleció del número de còpies d'ADNmt en cervell (**Figura 5.30**).

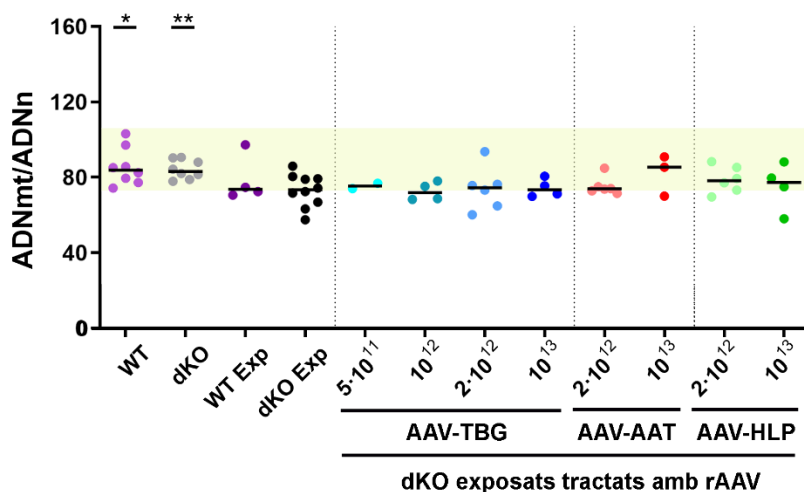


**Figura 5.30. Número de còpies d'ADNmt en cervell.** Número de còpies d'ADNmt mesurat per qPCR mitjançant sondes específiques Taqman™ en extractes d'ADN de cervell de ratolins WT (n=8) i dKO (n=8) no exposats, WT exposats (WT Exp) (n=4) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) (n=8) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG: dosis de 5·10<sup>11</sup> vg/kg (n=2), 10<sup>12</sup> vg/kg (n=4), 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=4); AAV-AAT: dosis de 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=4); AAV-HLP: dosis de 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=3)). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup. La zona ombrejada en groc representa el rang dels WT.

### 5.1.9.2. Intestí prim

Als 22 mesos d'edat no vam observar diferències en el número de còpies d'ADNmt en l'intestí prim de ratolins dKO i WT (**Figura 5.31**). En canvi, en ratolins dKO exposats a dThd i dUrd vam observar una depleció de l'ADNmt respecte els animals WT i dKO ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney, respectivament) (**Figura 5.31**).

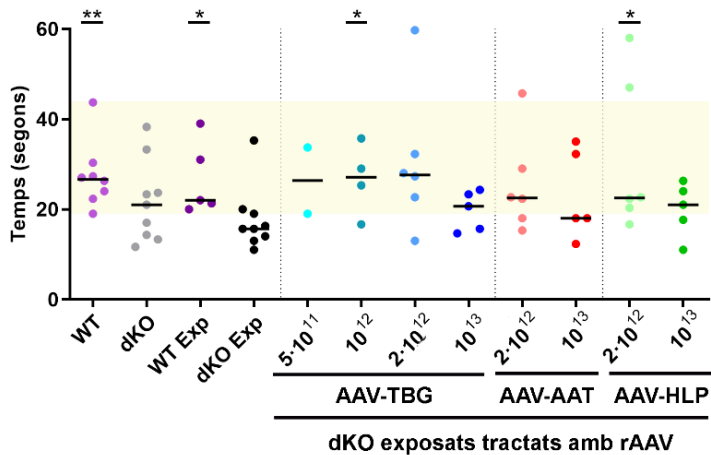
Cap dels tractaments amb rAAV en els dKO exposats va conduir ni a un increment ni a una depleció del número de còpies d'ADNmt en intestí prim respecte als dKO exposats. Tot i això, el 70% (25/35) dels animals tractats amb rAAV tenien valors de número de còpies a dins del rang del valors dels animals WT, mentre que això només passava en el 50% (5/10) dels ratolins dKO exposats no tractats amb rAAV (**Figura 5.31**).



**Figura 5.31. Número de còpies d'ADNmt en intestí prim.** Número de còpies d'ADNmt mesurat per qPCR mitjançant sondes específiques Taqman<sup>TM</sup> en extractes d'ADN de cervell de ratolins WT ( $n=8$ ) i dKO ( $n=8$ ) no exposats, WT exposats (WT Exp) ( $n=4$ ) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=10$ ) i tractats amb 3 rAAV a diferents dosis (AAV-TBG: dosis de  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ),  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ),  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-AAT: dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=4$ ); AAV-HLP: dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=3$ )). Les línies horitzontals representen la mediana de cada grup. La zona ombrejada en groc representa el rang del WT. Els asteriscs indiquen diferències significatives comparades amb el grup de ratolins dKO exposats a dThd i dUrd. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

### 5.1.10. AVALUACIÓ DE LA FUNCIÓ MOTORA I LA COORDINACIÓ – TEST ROTAROD

Vam determinar la coordinació i la funció motora dels ratolins mitjançant el test Rotarod on s'avalua la capacitat dels ratolins de romandre en una barra cilíndrica en rotació amb acceleració.



**Figura 5.32. Funció motora i coordinació.** Temps de latència obtingut en el test Rotarod en ratolins de 25 setmanes d'edat WT (n=8) i dKO (n=9) no exposats, WT exposats (WT Exp) (n=5) i dKO exposats no tractats (dKO Exp) (n= 9) i tractats amb 3 rAAVs a diferents dosis (AAV-TBG: dosis de 5·10<sup>11</sup> vg/kg (n=2), 10<sup>12</sup> vg/kg (n=4); 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i de 10<sup>13</sup> vg/kg (n=5); AAV-AAT: dosis de 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i de 10<sup>13</sup> vg/kg (n=5); AAV-HLP: dosis de 2·10<sup>12</sup> vg/kg (n=6) i 10<sup>13</sup> vg/kg (n=5). Les línies horitzontals mostren la mediana del temps de caiguda de cada grup. L'àrea ombrada en groc indica el rang del temps de latència dels ratolins WT. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives respecte els dKO exposats (p<0,05; \*\*p<0,01; test U de Mann-Whitney).

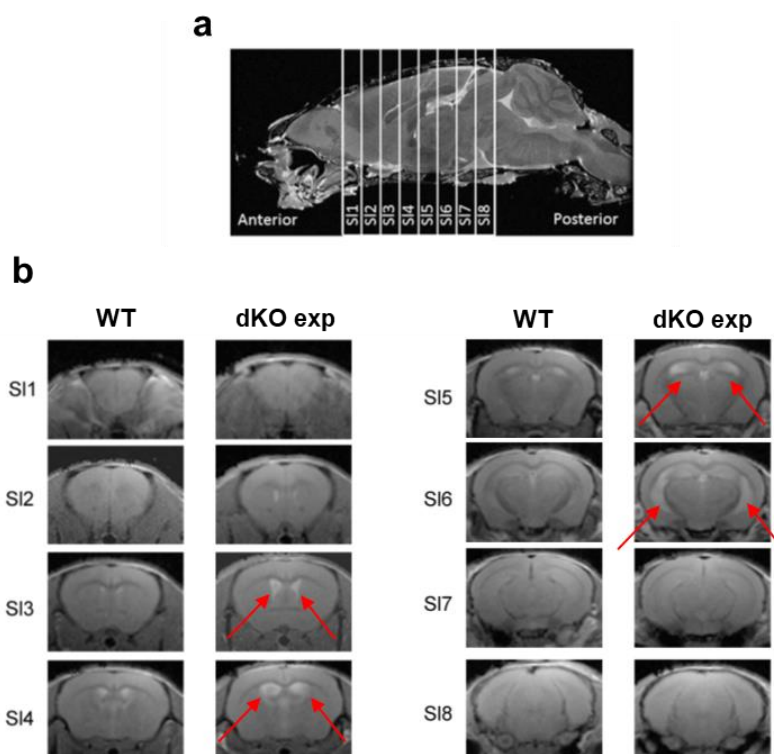
A les 25 setmanes d'edat no vam observar diferències en els temps de latència entre els ratolins WT (rang: 19 - 44 segons) i els ratolins dKO (rang: 12 - 38 segons). Tampoc vam observar diferències amb els ratolins WT exposats. No obstant, en ratolins dKO exposats a dThd i dUrd vam observar una reducció significativa del temps de latència en (rang dels ratolins dKO exposats: 11 - 35 segons) respecte els WT (p<0,01; test U de Mann-Whitney) (Figura 5.32).

En animals tractats amb rAAV, vam observar una gran dispersió en els temps de latència entre els diferents animals i només vam observar diferències significatives entre el grup de dKO tractats amb 10<sup>12</sup> vg/kg de l'AAV-TBG i 2·10<sup>12</sup> vg/kg de l'AAV-HLP respecte els

dKO exposats sense tractar. No obstant, el 69% dels ratolins tractats amb rAAV (27/39) tenien valors dins del rang o superiors als valors dels WT, mentre que només el 33% (3/9) dels dKO exposats presentaven valors situats a dins del rang WT (**Figura 5.32**).

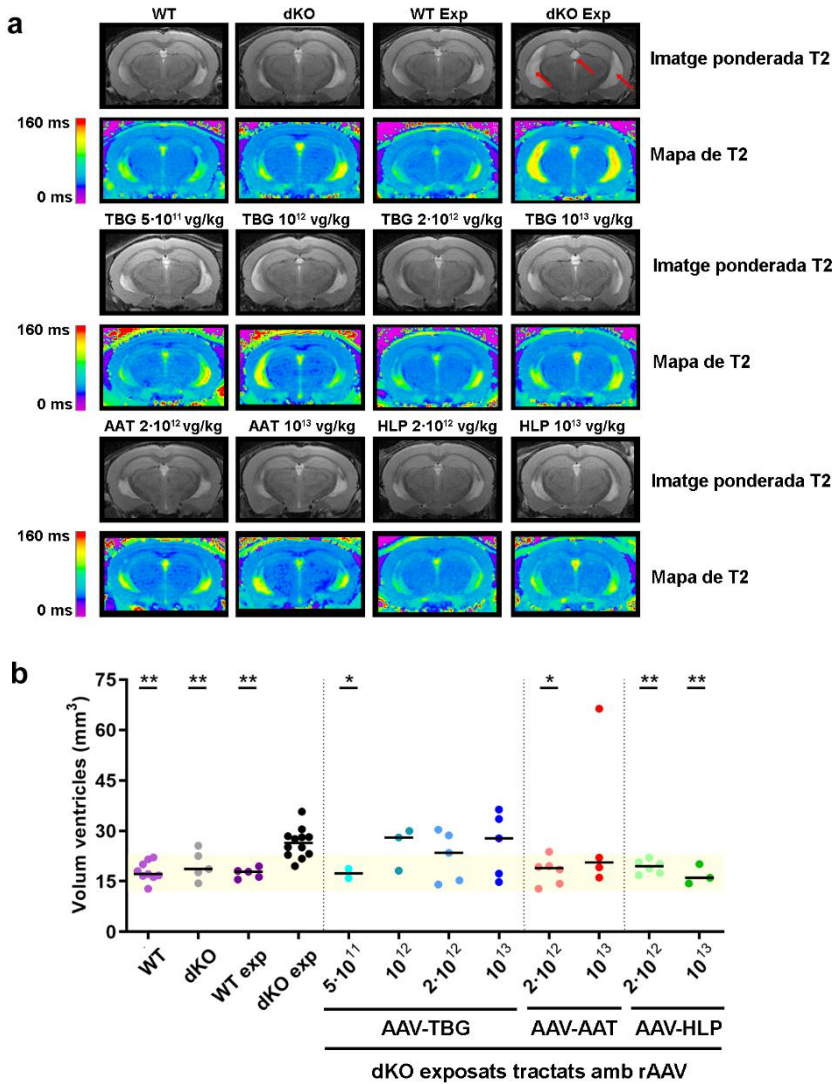
### 5.1.11. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA DE CERVELL

Un dels trets més característics dels pacients de MNGIE és que tots presenten leucoencefalopatia en les imatges obtingudes per ressonància magnètica nuclear de cervell [11]. En el cas del model dKO, l'exposició a dThd i dUrd durant tota la seva vida potencia el desenvolupament d'aquest tret fenotípic [104]. Nosaltres vam realitzar estudis d'imatge de cervell per ressonància magnètica nuclear en ratolins de 84 setmanes d'edat. En la **Figura 5.33a**, es pot veure un tall sagital d'una imatge de cervell ponderada en T2 on es mostra la localització dels talls coronals analitzats.



**Figura 5.33. Imatge per ressonància magnètica de cervell.** **a)** Imatge sagital del cervell ponderada en T2 on es pot veure la localització dels talls coronals que vam utilitzar per la quantificació del volum dels ventricles. **b)** Imatges ponderades en T2 de 1 mm de gruix de talls coronals de ratolins WT no exposats i ratolins dKO exposats. Les fletxes indiquen àrees hiperintenses en T2.





**Figura 5.34. Quantificació del volum dels ventricles.** **a**) Imatges ponderades en T2 (fila superior) i mapes de T2 (fila inferior) de talls coronals de 1 mm de gruix (corresponents a la SI6 de la **Figura 5.33**). **b**) Volum dels ventricles en ratolins WT ( $n=9$ ), dKO ( $n=5$ ), WT exposats (WT Exp) ( $n=5$ ), dKO exposats no tractats (dKO Exp) ( $n=12$ ), i dKO exposats tractats amb rAAV a diferents dosis (AAV-TBG:  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg  $n=2$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n=3$ ,  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg  $n=5$  i  $10^{13}$  vg/kg  $n=5$ ; AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg  $n=6$  i  $10^{13}$  vg/kg  $n=4$ ; AAV-HLP:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg  $n=6$  i  $10^{13}$  vg/kg  $n=3$ ). El volum dels ventricles es va quantificar utilitzant mapes de T2 com a la suma del volum dels ventricles de cadascuna de les seccions en la **Figura 5.33**. La regió ombrejada en groc indica el rang del volum dels ventricles en ratolins WT. Els asterisc indiquen diferències significatives comparades amb els dKO exposats ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ; Test U de Mann-Whitney). El volum dels ventricles per sobre de la mitjana més 3 desviacions estàndard es va considerar outlier i es van excloure de l'anàlisi (1 ratolí tractat amb l'AAV-TBG  $10^{12}$  vg/kg, i 1 ratolí tractat amb l'AAV-TBG  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg).

En el cas dels ratolins dKO exposats vam observar àrees hiperintenses, indicatives de líquid cefalorraquidi, més grans que les observades en ratolins dKO no exposats, WT exposats i WT no exposats (**Figura 5.33b i Figura 5.34**). Aquestes àrees hiperintenses estaven localitzades a les regions que corresponen al tercer ventricle i els ventricles laterals, cosa que indicava un engrandiment dels ventricles.

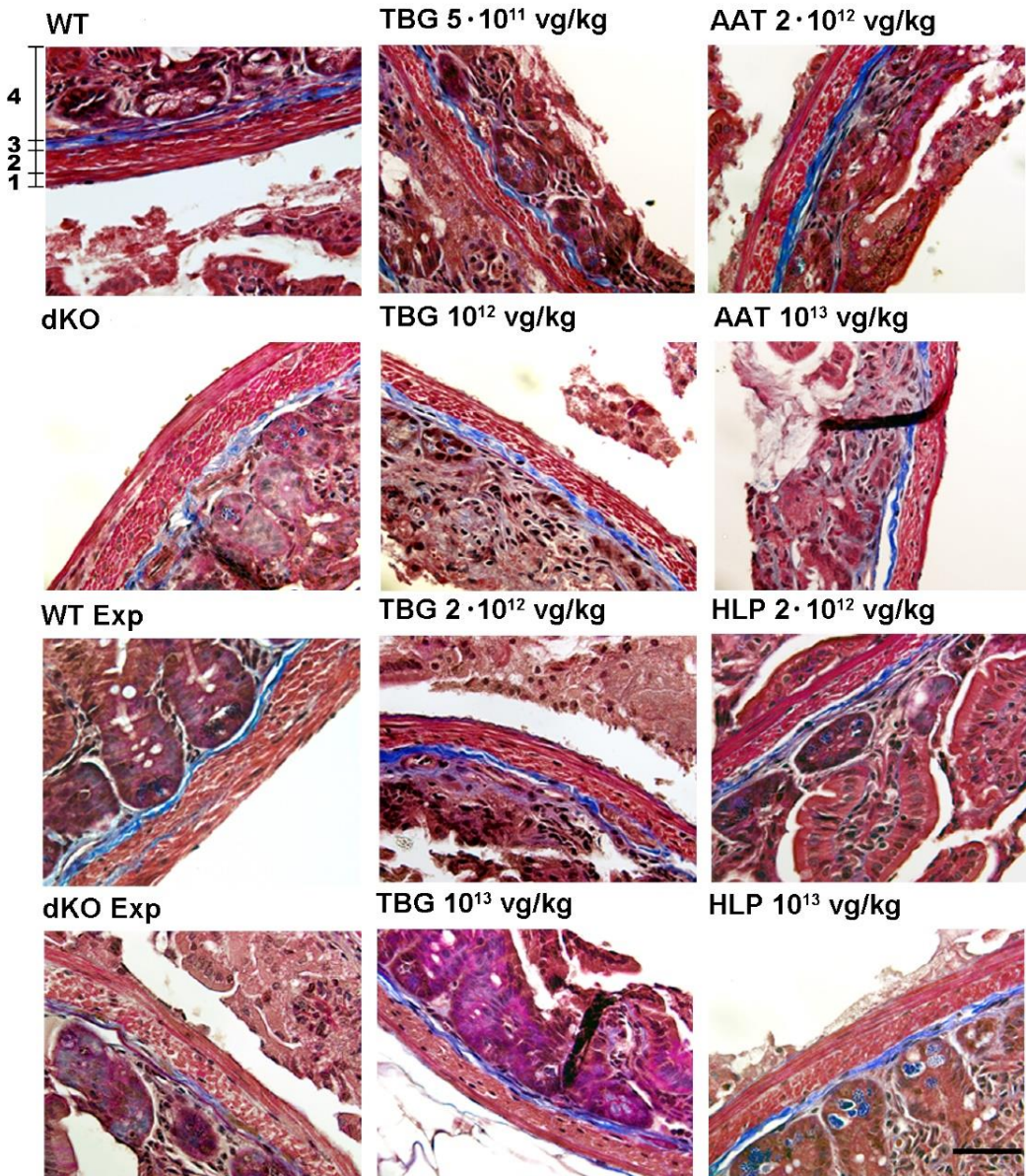
Adicionalment, vam quantificar el volum dels ventricles mitjançant els mapes de T2 i vam detectar que els ventricles dels ratolins dKO exposats eren significativament majors que els dels WT ( $p < 0,01$ ; test U de Mann-Whitney).

En canvi, en ratolins dKO no exposats i ratolins WT exposats el volum dels ventricles es mantenien iguals. Pel que fa als ratolins tractats amb l'AAV-AAT i AAV-HLP, vam observar que els seus ventricles presentaven un volum dins del rang dels WT (excepte en 1 animal tractat amb AAV-AAT dosi  $10^{13}$  vg/kg que presentava hidrocefàlia) (**Figura 5.33b**). En canvi, en els ratolins tractats amb l'AAV-TBG, vam observar que només 6 /14 ratolins presentaven un volum dels ventricles dins del rang WT (**Figura 5.33b**).

Els volums dels ventricles al moment de la ressonància (84 setmanes aproximadament) va correlacionar amb el contingut de dThd en cervell al final de l'estudi en tots els grups (Rho de Spearman  $r = 0,324$ ,  $p = 0,014$ ,  $n = 57$ , excloent 2 valors extrems de volum dels ventricles;  $r = 0,358$ ,  $p = 0,005$ ,  $n = 59$ , incloent tots els valors) i amb els valors obtinguts en el test de Rotarod (Rho de Spearman  $r = -0,348$ ,  $p = 0,0068$ ,  $n = 59$ , excloent 2 valors extrems de volum ventricular), però no amb el contingut de dThd en plasma o fetge.

### 5.1.12. DETERMINACIÓ DE LA PRESENCIA DE COL-LAGEN EN LA CAPA MUSCULAR INTESTINAL

Un dels trets més característics dels pacients de MNGIE, és la dismotilitat intestinal [11]. Està descrit que l'exposició crònica del ratolí dKO a sobrecàrrega de dThd i dUrd provoca una acumulació de col·lagen en la capa muscular de l'intestí, indicat per fibrosi i dany muscular [104]. Nosaltres vam realitzar estudis histològics en talls d'intestí prim mitjançant la tinció tricròmica de Masson per tal d'observar aquest tret fenotípic. Tot i així, no vam observar una major infiltració de col·lagen ni en la capa muscular longitudinal ni en la capa muscular circular de l'intestí de ratolins dKO exposats i no exposat (**Figura 5.35**).



**Figura 5.35. Tinció tricròmica de Masson d'intestí prim.** El blau és indicador de col·lagen, el vermell de citoplasma i el negre de nuclis. Exemple d'imatges de seccions de l'intestí prim de 3 µm de gruix. A la imatge del ratolí WT s'indiquen les diferents capes histològiques de l'intestí prim amb números: (1) Capa muscular longitudinal, (2) capa muscular circular, (3) submucosa i (4) mucosa. Per a una millor visualització de les diferències entre colors, les imatges es van obrir en format TIFF i es van ajustar el to i saturació amb el programa Adobe Photoshop (Adobe® Photoshop® CS5 extended v.12.0, San Jose, CA, USA). Barra d'escala= 40 µm.

## 5.2. OPTIMITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA CODIFICANT DE *TYMP*

### 5.2.1. GENERACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES

Per a modificar la seqüència codificant del gen *TYMP* (GenBank: BC052211.2) vam utilitzar 4 algoritmes d'optimització de codons diferents que tenien en compte el biaix en l'ús de codó en *Homo sapiens* (Taula 2.3).

Les seqüències resultants de cadascun dels algoritmes d'optimització estan disponibles a l'annex I.

El CAI és un paràmetre que mesura quant de pròxima és una seqüència a utilitzar el codó més freqüent en totes les posicions [194]. En tots els algoritmes, l'optimització de la seqüència va resultar en un increment del CAI respecte el de la seqüència WT (Taula 5.1) i per tant, va comportar una utilització de codons més freqüents que la seqüència WT. Un segon paràmetre important de les seqüències codificants és el percentatge de GC ja que s'ha vist que pot influir a nivell d'estabilitat dels ARNm [217,218], en aquest cas veiem que el percentatge global pràcticament no varia respecte la seqüència WT.

A més cadascun dels algoritmes tenia en compte altres paràmetres que també s'ha descrit que poden influir en l'expressió de les seqüències codificants (Taula 4.22). L'algoritme B i D van evitar l'estructures secundàries de l'ARNm, l'algoritme C i D van tenir en compte la utilització de parells de codons freqüents, i tots ells també van evitar la presència de les dianes de restricció *BamHI*, *XbaI* i *XhoI*.

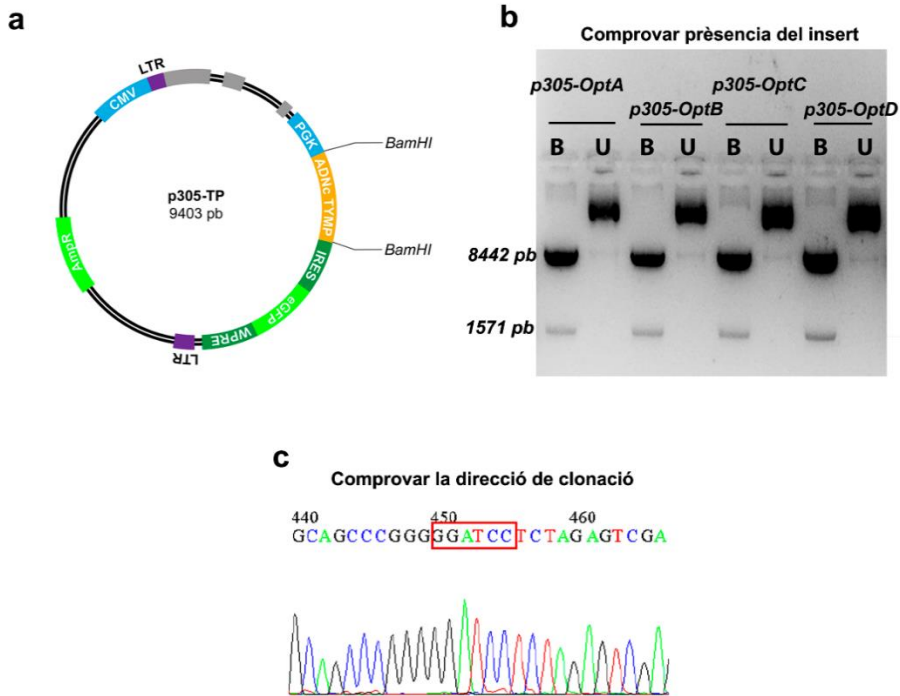
**Taula 5.1. Característiques principals de les seqüències optimitzades**

	Codons modificats	CAI	Percentatge GC
<b>Seqüència optimitzada A</b>	212/483	0,99	71%
<b>Seqüència optimitzada B</b>	216/483	0,9	69%
<b>Seqüència optimitzada C</b>	247/483	0,85	67%
<b>Seqüència optimitzada D</b>	272/483	0,91	64%
<b>Seqüència wild-type</b>	-	0,78	69%

<sup>1</sup> Codon Adaptation Index



## 5.2.2. CONSTRUCCIÓ DELS VECTORS



**Figura 5.36. Clonatge de les seqüències optimitzades.** a) Esquema del vector p305 amb les dianes BamHI utilitzades pel clonatge. b) RFPL de comprovació dels diferents clons obtingut amb les seqüències optimitzades. B indica tallat utilitzant l'enzim BamHI i U indica no tallat. c) Seqüenciació de la regió de lligació entre el vector i la seqüència optimitzada X. El rectangle vermell indica la diana de restricció de l'enzim BamHI.

Per al clonatge de les seqüències en el vector p305 vam lligar les diferents seqüències optimitzades un vector que contenia el promotor del hPGK i una seqüència IRES que permetia l'expressió del gen eGFP utilitzant la diana BamHI. A la **Figura 5.36a** es pot veure un esquema del vector ja clonat. A continuació vam comprovar la presència de la seqüència clonada mitjançant una reacció de lligació (**Figura 5.36b**) i finalment vam seqüenciar aquells clons que contenien la seqüència optimitzada per determinar que la clonació s'havia realitzat en la direcció correcta (**Figura 5.36c**). A continuació vam produir vectors lentivirals de cadascuna de les seqüències per transduir diverses línies cel·lulars.

### 5.2.3. EFICIÈNCIA D'EXPRESSIONI DE *TYMP* IN VITRO

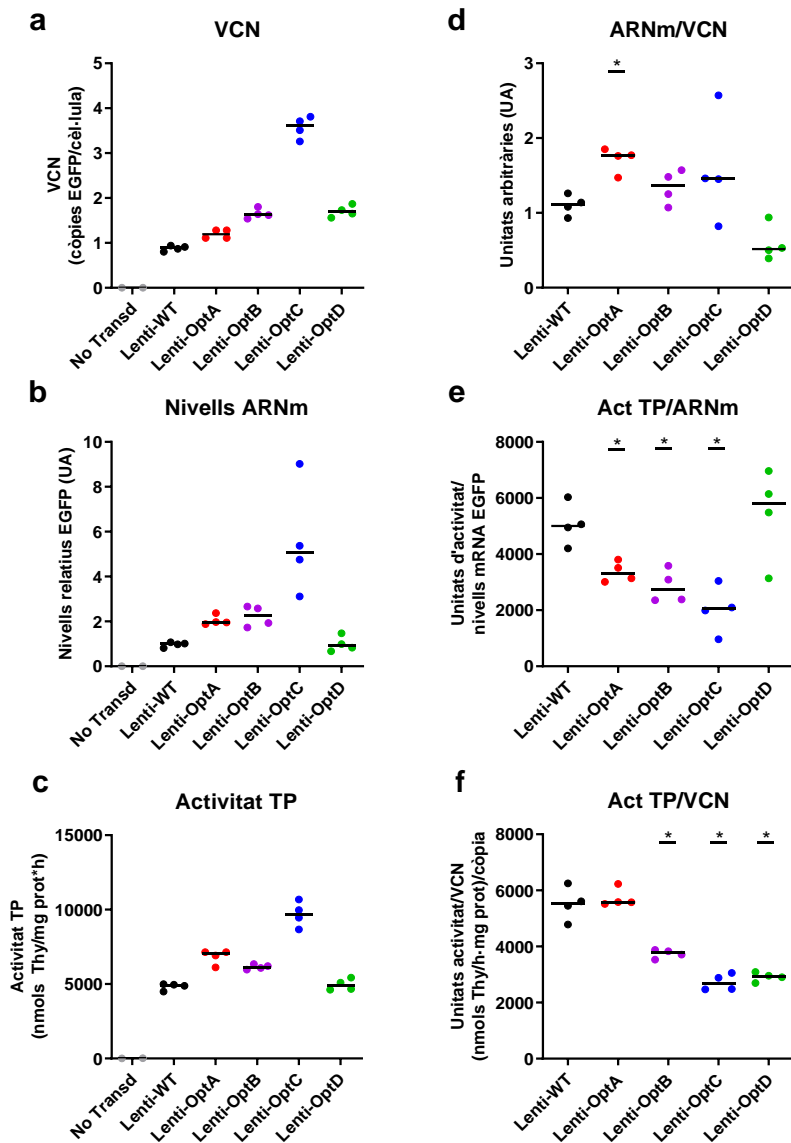
Per analitzar fins a quin grau les modificacions dels codons en cada seqüència havia millorat l'expressió vam tenir en compte 3 variables: el número de còpies del vector per cèl·lula (VCN), els nivells d'ARNm de *TYMP* i l'activitat TP. Posteriorment, vam calcular els ràtios entre aquestes variables per a tenir una mesura de l'eficiència d'expressió a nivell de missatger (ARNm entre VCN, indicatiu de l'eficiència de transcripció i/o estabilitat de l'ARNm), a nivell post-transcripcional (activitat TP entre ARNm, indicatiu de l'eficiència de traducció) i d'expressió global del vector (activitat TP entre VCN). Aquest estudi es va dur a terme utilitzant 4 línies cel·lulars diferents.

#### 5.2.3.1. Resultats de l'optimització en la línia cel·lular HEK293T

En primer lloc vam testar les seqüències dissenyades en la línia cel·lular HEK293T, una línia cel·lular humana embrionària de ronyó immortalitzada, la qual presenta una activitat TP molt baixa. Totes les cèl·lules van ser transduïdes a una MOI de 10 partícules víriques/cèl·lula. El VCN va ser al voltant d'1 còpia per cèl·lula amb els vectors Lenti-OptA (1,20 còpies del vector per cèl·lula) i Lenti-WT (0,88 còpies del vector per cèl·lula), d'1,7 còpies per cèl·lula amb els vectors Lenti-OptB i Lenti-OptD, i de 3,6 còpies per cèl·lula transduïda amb el Lenti-OptC (**Figura 5.37a**).

Posteriorment, vam quantificar els nivells d'ARNm de *TYMP* en cada línia transduïda i la vam referenciar amb els nivells d'ARNm de la línia transduïda amb el Lenti-WT. Els nivells d'expressió de les cèl·lules Hek293T transduïdes amb el Lenti-OptA i el Lenti-OptB eren 2 i 2,2 vegades superior al WT, respectivament, 5,6 vegades amb les cèl·lules transduïdes amb Lenti-OptC. La traducció amb el Lenti-OptD va produir nivells d'ARNm de *TYMP* similars al Lenti-WT (**Figura 5.37b**).

La transducció amb els diferents vectors va incrementar l'activitat TP de les cèl·lules entre 400 i 800 vegades. La transducció amb el Lenti-WT (de mitjana 4.834 nmols Thy/h · mg prot) i el Lenti-OptD (de mitjana 4.951 nmols Thy/h · mg prot) va donar lloc a activitats TP similars. A continuació, la transducció amb el Lenti-OptB va donar lloc a una activitat TP de mitjana de 6.151 nmol Thy/h · mg prot, el Lenti-OptA un valor mitjà de 6.831 nmols Thy/h · mg prot. Els valors més alts d'activitat, d'acord amb el VCN més alt, va ser en el cas de la transducció amb el Lenti-OptC (de mitjana 9.694 nmols Thy/h · mg prot) (**Figura 5.37c**).



**Figura 5.37. Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular HEK293T.** Transducció amb LVs (WT: wild-type; OptA: seqüència optimitzada A, OptB: seqüència optimitzada B; OptC: seqüència optimitzada C; OptD: seqüència optimitzada D) a una MOI de 10 vectors/cèl·lula. Una setmana post transducció vam determinar el VCN (a) i els nivells relatius de l'ARNm (b), i l'activitat TP (c). A continuació vam determinar els quocients entre nivells d'ARNm i VCN (d), activitat TP entre nivell d'ARNm; unitats arbitràries es refereix a el quocient entre el valor relatiu de nivells d'ARNm entre el VCN (e) i activitat TP entre VCN (f). Hi ha una n=4 per cada seqüència i una n=2 per les cèl·lules no transduïdes (No Transd). Les línies horitzontals indiquen la mediana i els asteriscs indiquen diferències significatives respecte la transducció amb el Lenti-WT (\*p<0,05; test U de Mann-Whitney).

Quan vam calcular els diferents ràtios, vam observar que el Lenti-OptA expressava uns nivells d'ARNm per VCN superiors al Lenti-WT ( $p < 0,05$ ; test U de Mann-Whitney) (**Figura 5.37d**). Pel que fa al quocient entre activitat TP i l'ARNm vam observar que el Lenti-OptA, el Lenti-OptB i Lenti-OptC va disminuir aquest ràtio respecte el Lenti-WT, mentre que amb el Lenti-OptD era similar (**Figura 5.37e**). Finalment, l'eficiència d'expressió d'activitat TP per VCN va disminuir amb les seqüències optimitzades B, C i D, i només la seqüència optimitzada amb l'algorisme A va tenir una eficiència d'expressió similar a la del WT (**Figura 5.37f**).

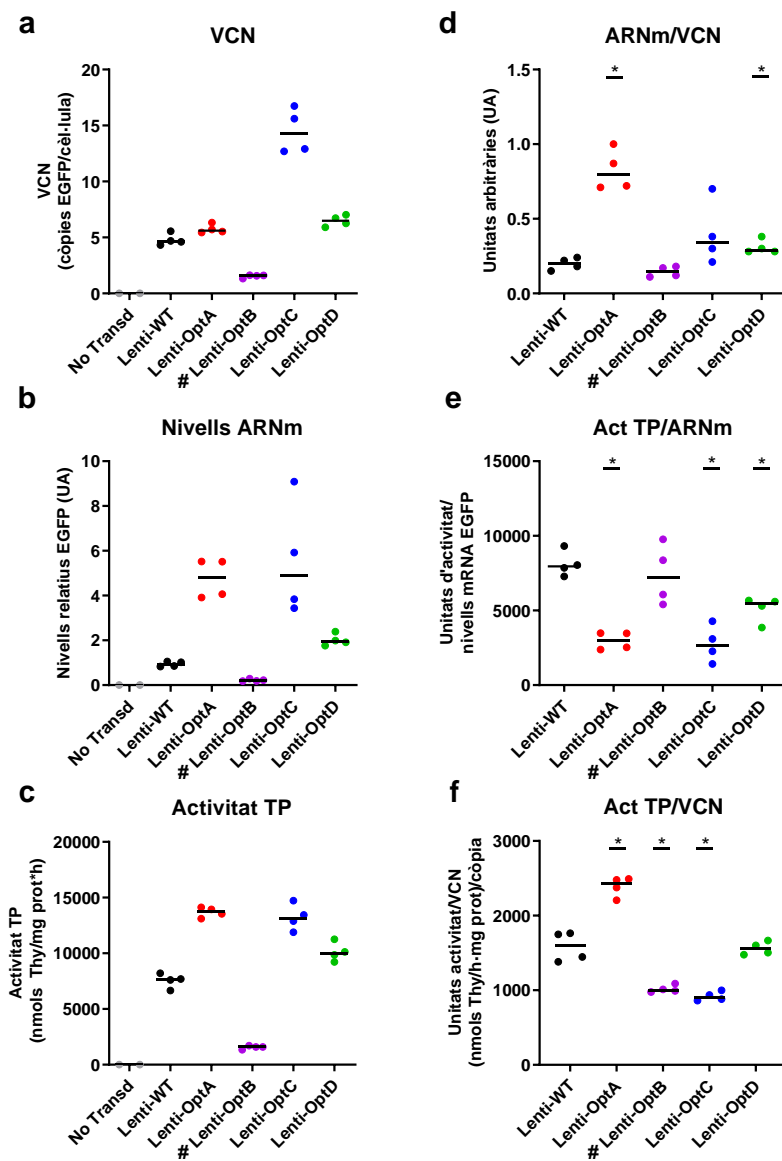
### 5.2.3.2. Resultats de l'optimització en la línia cel·lular Huh7

A continuació vam testar les seqüències en la línia cel·lular hepàtica Huh7, ja que la diana de la nostra teràpia és el fetge. Es tracta d'una línia cel·lular d'hepatòcits derivats d'un carcinoma cel·lular extrets d'un tumor hepàtic i presenta una activitat TP molt baixa.

En primer lloc vam determinar el VCN. En aquest cas, les Huh7 també van ser transduïdes a una MOI de 10, menys amb el Lenti-OptB que va ser a una MOI de 1 (degut a que no quedava suficient quantitat per fer-ho a una MOI de 10). En aquesta línia cel·lular, el VCN va ser més alt. La transducció amb el Lenti-WT (4,80 còpies del vector per cèl·lula), Lenti-OptA (5,75 còpies del vector per cèl·lula) i Lenti-OptD (6,48 còpies del vector per cèl·lula) va donar lloc a transduccions similars en quant a VCN. Les Huh7 transduïdes amb el Lenti-OptC (14,5 còpies del vector per cèl·lula) va ser el vector lentiviral que va donar lloc a un VCN més alt. D'acord amb la MOI de transducció menor, el Lenti-OptB va ser el que va obtenir un VCN més baix (1,53 còpies del vector per cèl·lula) (**Figura 5.38a**).

A continuació, vam quantificar l'expressió de l'ARNm. Els nivells d'expressió en les cèl·lules Huh7 transduïdes amb el Lenti-OptA i Lenti-OptC eren 4,8 i 5,6 vegades superior al WT, respectivament vegades, i 2 vegades superior al WT en les Huh7 transduïdes amb el Lenti-OptD. D'acord amb el VCN, el Lenti-OptB va tenir els nivells d'expressió més baixos (0,2 respecte el WT) (**Figura 5.38b**).





**Figura 5.38. Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular Huh7.** Transducció amb LVs (WT: wild-type; OptA: seqüència optimitzada A; OptC: seqüència optimitzada C; OptD: seqüència optimitzada D) a una MOI de 10 vectors/cèl·lula. (#) El Lenti-OptB es va transduir a una MOI de 1. Una setmana post transducció vam determinar el VCN (a) els nivells relatius de l'ARNm (b) i l'activitat TP (c). A continuació vam determinar els quocients entre nivells d'ARNm i VCN (d), activitat TP entre nivell d'ARNm; unitats arbitràries es refereix a el quocient entre el valor relatiu de nivells d'ARNm entre el VCN (e) i activitat TP entre VCN (f). Hi ha una n=4 per cada seqüència i una n=2 per les cèl·lules no transduïdes (No Transd). Les línies horitzontals indiquen la mediana i els asteriscs indiquen diferències significatives respecte la transducció amb el Lenti-WT (\*p<0,05; test U de Mann-Whitney).

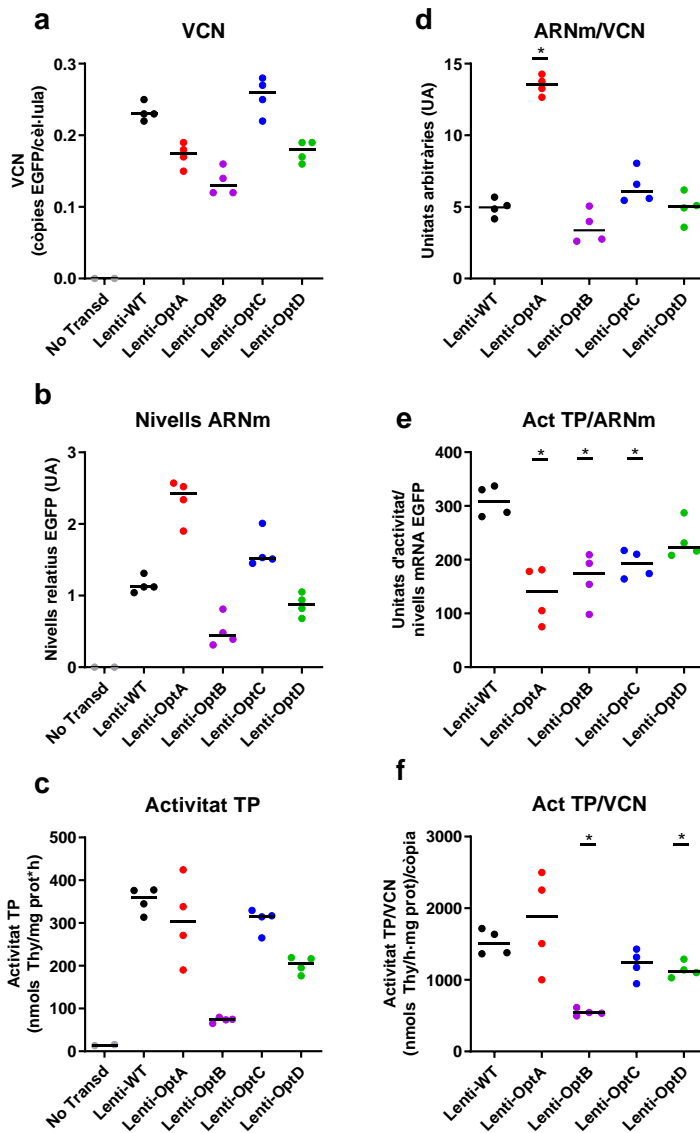
La tercera variable que vam determinar va ser l'activitat TP. Les cèl·lules Huh7 presenten una activitat TP molt baixa (11,6 nmols Thy/h · mg prot (dades de totes les determinacions d'activitat TP de la línia cel·lular Huh7 realitzades al laboratori)). La transducció amb els diferents vectors va incrementar l'activitat TP de les cèl·lules entre 140 i 1.200 vegades. La transducció amb el Lenti-OptA (de mitjana 13.681 nmols Thy/h · mg prot) i el Lenti-OptC (de mitjana 13.236 nmols Thy/h · mg prot) va donar lloc a les activitats TP més altes. A continuació, la transducció amb el Lenti-OptD va donar lloc a una activitat TP mitjana de 10.113 nmol Thy/h · mg prot), el Lenti-WT un valor de 7.542 nmols Thy/h · mg prot. Els valors més baixos d'activitat va ser en el cas de la transducció amb el Lenti-OptB (1.555 nmols Thy/h · mg prot) (**Figura 5.38c**)

Quan vam normalitzar els nivells d'ARNm entre VCN, vam observar que aquest ràtio era més alt en les Huh7 transduïdes amb el Lenti-OptA i amb el Lenti-OptD que a les transduïdes amb el Lenti-WT (**Figura 5.38d**). Pel que fa al quocient entre activitat TP i els nivells d'ARNm vam observar que la transducció amb el Lenti-OptA, Lenti-OptC i Lenti-OptD disminuïa aquest ràtio respecte el Lenti-WT (**Figura 5.38e**). Finalment, l'eficiència d'expressió d'activitat TP per VCN va augmentar respecte el WT en el cas de la seqüència optimitzada A, es va mantenir a uns valors similars al WT en la seqüència optimitzada D i va disminuir amb les seqüències optimitzades B i C (**Figura 5.38f**).

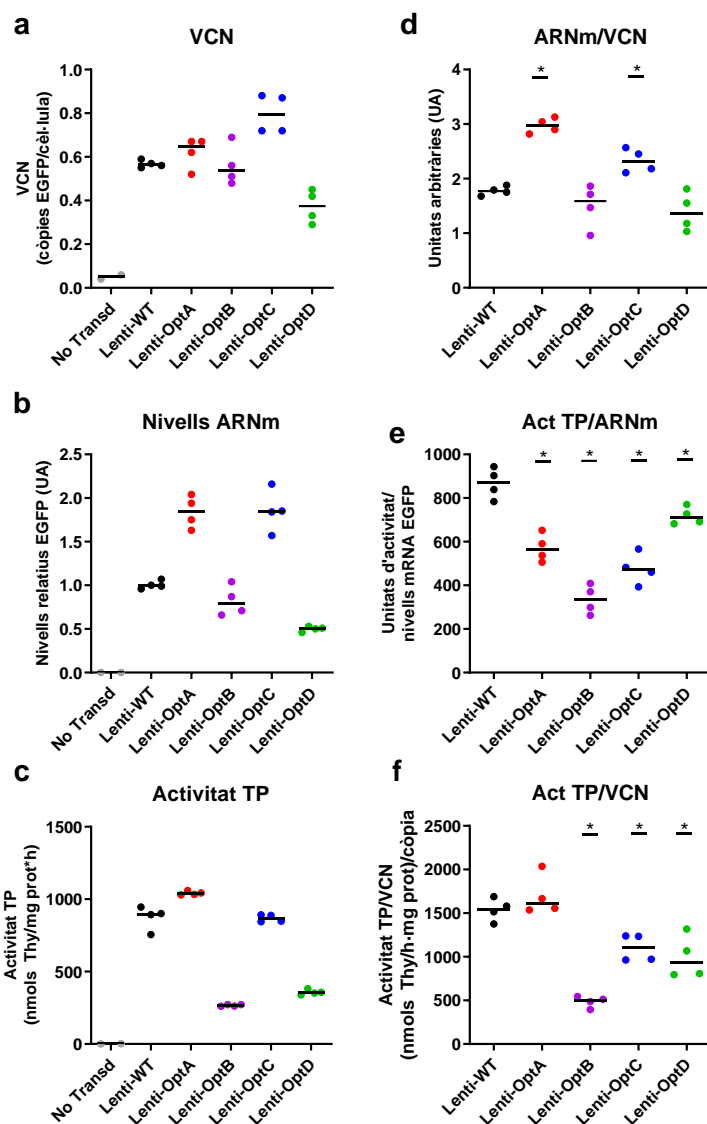
### 5.2.3.3. Resultats de l'optimització en dues línies LCL derivades de pacients de MNGIE

Finalment, vam testar aquestes optimitzacions de seqüència en dues línies LCLs derivades de pacients de MNGIE generades prèviament al nostre laboratori. Van ser creades en el context de la teràpia gènica amb LVs dirigits a les cèl·lules mare hematopoètiques, i la nomenclatura P1 i P2 utilitzada és en relació a aquell treball [96].

En les línies cel·lulars LCL derivades de pacients, la transducció va ser similar per tots els vectors. En la línia cel·lular P1-LCL vam obtenir valors al voltant de 0,2 còpies del vector per cèl·lula (**Figura 5.39a**) i en la línia P2-LCL vam obtenir valors de transducció més alts i al voltant de 0,6 còpies del vector per cèl·lula (**Figura 5.40a**).



**Figura 5.39. Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular P1-LCL.** Transducció amb LVs (WT: wild-type; OptA: seqüència optimitzada A, OptB: seqüència optimitzada B; OptC: seqüència optimitzada C; OptD: seqüència optimitzada D) a una MOI de 10 vectors/cèl·lula. Una setmana post transducció vam determinar el VCN (a), els nivells relatius de l'ARNm (b) i l'activitat TP (c). A continuació vam determinar els quocients entre nivells d'ARNm i VCN (d), activitat TP entre nivell d'ARNm; unitats arbitràries es refereix a el quocient entre el valor relatiu de nivells d'ARNm entre el VCN (e) i activitat TP entre VCN (f). Hi ha una n=4 per cada seqüència i una n=2 per les cèl·lules no transduïdes (No Transd). Les línies horitzontals indiquen la mediana i els asteriscs indiquen diferències significatives respecte la transducció amb el Lenti-WT (\*p<0,05; test U de Mann-Whitney).



**Figura 5.40. Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular P2-LCL.** Transducció amb LVs (WT: wild-type; OptA: seqüència optimitzada A, OptB: seqüència optimitzada B; OptC: seqüència optimitzada C; OptD: seqüència optimitzada D) a una MOI de 10 vectors/cèl·lula. Una setmana post transducció vam determinar el VCN (a), els nivells relatius de l'ARNm (b) l'activitat TP (c). A continuació vam determinar els quocients entre nivells d'ARNm i VCN (d), activitat TP entre nivell d'ARNm; unitats arbitràries es refereix a el quocient entre el valor relatiu de nivells d'ARNm entre el VCN (e) i activitat TP entre VCN (f). Hi ha una  $n=4$  per cada seqüència i una  $n=2$  per les cèl·lules no transduïdes (No Transd). Les línies horitzontals indiquen la mediana i els asteriscs indiquen diferències significatives respecte la transducció amb el Lenti-WT ( $*p<0,05$ ; test U de Mann-Whitney).

Posteriorment vam quantificar els nivells relatius d'ARNm del vector, vam obtenir valors unes 2 vegades superiors al WT per la seqüència optimitzada A i C en les dues línies cel·lulars LCL derivades de pacients. La seqüència optimitzada B va donar lloc a nivells d'expressió similars al WT en P2-LCL i inferiors al WT en P1-LCL. Per últim, la seqüència optimitzada D van donar lloc a nivells d'expressió similars al WT en P1-LCL i inferiors al WT en P2-LCL (**Figura 5.39b i Figura 5.40b**)

L'activitat TP de les LCLs de pacients és molt baixa comparada amb altres LCLs de controls sans [96]. La transducció amb tots els vectors va produir un augment de l'activitat TP de les cèl·lules d'entre 5 i 25 vegades, donant lloc a activitats TP d'aproximadament 300 nmols Thy/h·mg prot en les cèl·lules P1-LCL i de 900 nmols Thy/h·mg prot en les cèl·lules p2-LCL transduïdes amb el Lenti-OptA, Lenti-OptC i Lenti-WT. En les dues línies cel·lulars el Lenti-OptB va donar lloc a l'activitat TP més baixa (**Figura 5.39c i Figura 5.40c**).

El quocient ARNm entre el VCN entre les cèl·lules transduïdes amb el Lenti-OptA va ser superior a l'obtingut en les cèl·lules transduïdes amb el Lenti-WT, en les dues línies cel·lulars (**Figura 5.39d i Figura 5.40d**). En canvi, quan vam normalitzar l'activitat TP entre els nivells d'ARNm vam veure que per totes les seqüències optimitzades, aquest ràtio era inferior a l'obtingut per la seqüència WT. (**Figura 5.39e i Figura 5.40e**). Finalment, cap de les seqüències optimitzades va millorar l'expressió de la seqüència WT en valors d'activitat TP per VCN en aquestes línies cel·lulars i només la seqüència optimitzada amb l'algoritme A va tenir una eficiència d'expressió similar a la del WT (**Figura 5.39f i Figura 5.40f**).

#### 5.2.4. ELIMINACIÓ DE SEQÜÈNCIES CPG

Una altra estratègia d'optimització de seqüències és modificar el contingut de GC per tal de reduir la resposta immunitària innata sobre el vector [219]. Aquesta modificació consisteix a substituir aquelles posicions on es troben dinucleòtids CpG per altres codons que codifiquen el mateix aminoàcid. Vam decidir introduir aquesta optimització addicional sobre les seqüències WT, la seqüència obtinguda amb l'algoritme A (que era la que havia funcionat millor en Huh7) i la seqüència obtinguda amb l'algoritme D (que era la seqüència entre les optimitzades que presentava un ràtio activitat TP/ARNm del vector (indicatiu de l'eficiència de traducció) major en totes les línies cel·lulars). L'eliminació de

les seqüències CpG la vam fer manualment. La modificació va consistir a canviar aquells codons on hi havia una seqüència CpG pel codó més freqüent (**Taula 2.3**) que codifica el mateix aminoàcid i no conté CpG. En els casos on la C era l'última base d'un codó i la G la primera base del següent codó, vam canviar el primer codó pel més freqüent que no produïa aquesta seqüència. A la **Taula 5.2** es pot observar el número de modificacions fetes a cada seqüència per eliminar totes les seqüències CpG de l'ADNc codificant del vector.

**Taula 5.2. Número de dinucleòtids CpG substituïts**

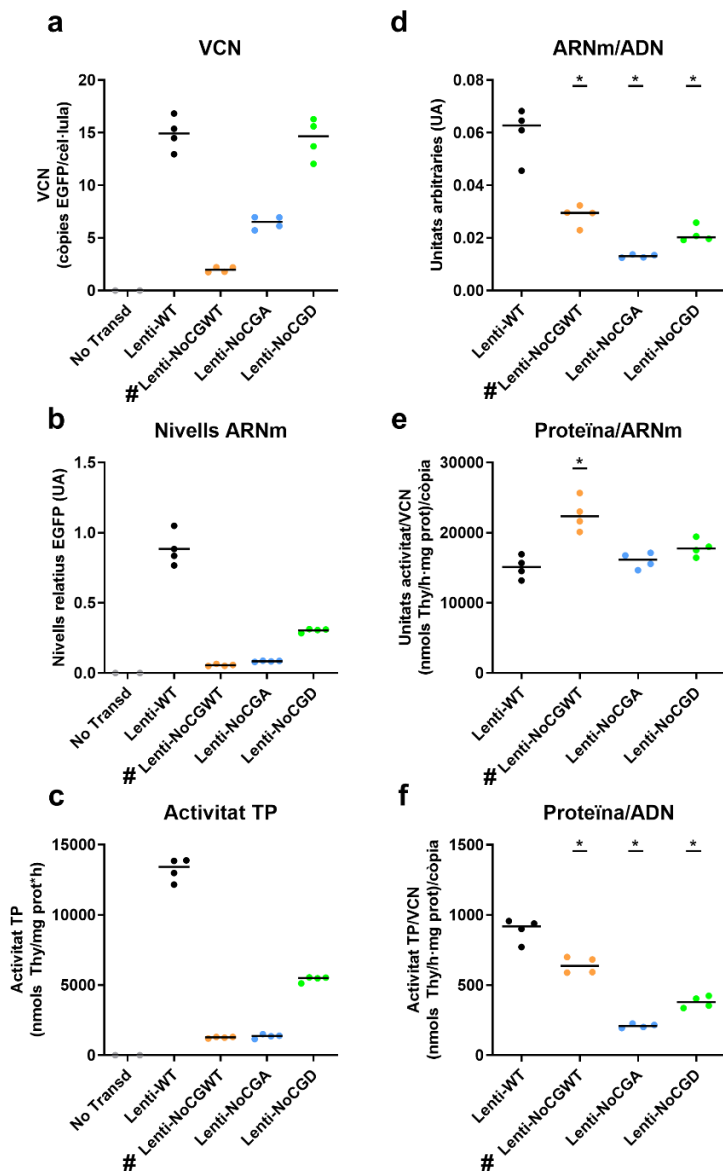
Seqüència	Número de codons modificats	Nomenclatura LV
Seqüència WT	127*	LentiNoCGWT
Seqüència optimitzada A	111	LentiNoCGA
Seqüència optimitzada D	70	LentiNoCGD

\* Una de les modificacions va ser per eliminar la diana de restricció BamH1 (necessària pel clonatge) que es generava amb el canvi de codons.

Per a veure si aquestes modificacions mantenien la capacitat de generar una proteïna funcional, vam clonar les seqüències en el plasmidi p305 i posteriorment vam produir els vectors lentivirals per tornar a repetir el mateix estudi in vitro que anteriorment, tot i que en aquest cas només ho vam fer amb la línia cel·lular Huh7.

Vam transduir les cèl·lules a una MOI de 10 amb tots els vectors menys amb el Lenti-NoCGWT (MOI de 5 degut a problemes amb la producció de vectors). La transducció amb el Lenti-WT i Lenti-NoCGD va donar lloc a VCN similars (al voltant de 14 còpies de vector per cèl·lula). La transducció amb el Lenti-NoCGA (6,5 còpies del vector per cèl·lula) i amb el Lenti-NoCGWT (2 còpies del vector per cèl·lula) (**Figura 5.41a**).

Els nivells d'ARNm de *TYMP* més alts es van obtenir a les cèl·lules transduïdes amb el Lenti-WT (0,9 vegades els nivells WT). A continuació, el Lenti-NoCGD va obtenir uns nivells de 0,3 vegades els nivells WT. La transducció amb el Lenti-NoCGA (0,1 vegades els nivells WT) i el Lenti-NoCGWT (0,06 vegades els nivells WT) van donar lloc a nivells similars i molt baixos en comparació amb el Lenti-WT (**Figura 5.41b**).



**Figura 5.41. Eficiència d'expressió de TYMP en la línia cel·lular Huh7.** Transducció amb LVs (WT: wild-type; NoCGA: seqüència optimitzada A modificada sense CpG; NoCGD: seqüència optimitzada D modificada sense CpG) a una MOI de 10 vectors/cèl·lula. (#) El Lenti-NoCGWT es va transduir a una MOI de 5. Una setmana post transducció el VCN (a), els nivells relatius de l'ARNm (b) i l'activitat TP (c). A continuació vam determinar els quocients entre nivells d'ARNm i VCN (d), activitat TP entre nivell d'ARNm; unitats arbitràries es refereix a el quocient entre el valor relatiu de nivells d'ARNm entre el VCN (e) i activitat TP entre VCN (f). Hi ha una n=4 per cada seqüència i una n=2 per les cèl·lules no transduïdes (No Transd). Les línies horitzontals indiquen la mediana i els asteriscs indiquen diferències significatives respecte la transducció amb el Lenti-WT (\*p<0,05; test U de Mann-Whitney).

Els valors més alts d'activitat TP es va obtenir a les cèl·lules transduïdes amb el Lenti-WT (13.216 nmols Thy/h · mg prot). La transducció amb el Lenti-NoCGD va donar lloc a valors d'activitat TP de mitjana de 5.416 nmols Thy/h · mg prot. Finalment, la transducció amb el Lenti-NoCGA (1.353 nmols Thy/h · mg prot) i el Lenti-NoCGWT (1.267 nmols Thy/h · mg prot) van donar lloc a activitats TP similars i molt baixes en comparació amb el Lenti-WT (**Figura 5.41c**).

El ràtio entre els nivells d'ARNm i el VCN van donar inferior en totes les seqüències modificades respecte el ràtio de la transducció amb la seqüència WT (**Figura 5.41d**).

Quan vam normalitzar l'activitat TP entre els nivells d'ARNm vam veure que per totes les seqüències optimitzades, aquest ràtio era igual a l'obtingut per la seqüència WT excepte per la seqüència NoCGWT. (**Figura 5.41e**).

Finalment, quan vam calcular l'activitat per VCN, no hi havia cap seqüència que superés la WT (892 nmols Thy/h · mg prot · còpia), i la seqüència WT sense CG ( $641 \pm 59$  nmols Thy/h · mg prot · còpia) va ser la que més es va acostar al valor de la seqüència WT (**Figura 5.41f**).





## 6. DISCUSSIÓ

---



El MNGIE és una malaltia crònica i progressiva que afecta principalment el sistema digestiu, el sistema nerviós perifèric, el múscul esquelètic i, de forma asimptomàtica, el cervell. La malaltia té uns efectes devastadors en els pacients causant la mort de forma prematura [11]. La causa genètica del MNGIE són mutacions en el gen *TYMP* que codifica la TP [1]. Aquest enzim catalitza la degradació dels nucleòsids dThd i dUrd a timina i uracil, respectivament i per tant, en pacients de MNGIE, aquests nucleòsids s'acumulen i resulten tòxics per la replicació i manteniment de l'ADNmt. Per aquesta raó, totes les teràpies proposades pel tractament de MNGIE han anat dirigides a reduir els nivells sistèmics de nucleòsids, ja sigui eliminant-los directament de la circulació via diàlisi, o bé teràpies de substitució enzimàtica. I fins ara, les úniques alternatives terapèutiques on s'ha observat una correcció bioquímica i una lleugera millora clínica a llarg termini han estat el transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques [76,77,79] i el transplantament de fetge [86,89,91]. Tot i així, aquestes dues teràpies tenen un risc considerable de mortalitat associat al propi procediment. També presenten altres inconvenients, com ara la dificultat de trobar donants compatibles, que fa que sigui necessari seguir buscant alternatives terapèutiques. A més, el fet que el MNGIE sigui una malaltia progressiva, fa necessari actuar quan abans sigui possible, millor inclús si el pacient encara no presenta símptomes, ja que un cop desenvolupats els símptomes, alguns d'ells són de reversió molt lenta després d'un tractament o fins i tot irreversibles [77]. En aquest sentit, un pacient que encara no presenta símptomes podria ser reticent a sotmetre's a un transplantament sense tenir-ne la necessitat immediata.

Per a substituir les opcions terapèutiques que estan disponibles actualment, en els últims anys, hem proposat diferents estratègies de teràpia gènica per al tractament del MNGIE. En primer lloc vam proposar un vector lentiviral SIN de tercera generació dirigit a les cèl·lules mare hematopoètiques en una estratègia de tractament *ex vivo* [96,97], i en segon lloc una teràpia gènica mediada per un vector adenoassociat dirigit al fetge en una estratègia de tractament *in vivo* [98,100].

Aquestes teràpies han demostrat la seva efectivitat en el model de ratolí de la malaltia, però aquest model està molt limitat degut a que presenta un fenotip gairebé exclusivament bioquímic. A més, de cara a la translació des dels estudis preclínic a la practica clínica, la teràpia gènica ha de superar un seguit de barreres en l'escalat

tant de producció dels vectors, adaptació de la dosi o resposta immunitària que fa molt necessari optimitzar el vector perquè aquest sigui el màxim potent. Un vector amb molta potència permetrà una bona eficàcia amb dosis més baixes, la qual cosa reduirà els costos de la teràpia i minimitzarà els riscos immunològics i d'altres tipus que es podrien associar a l'administració de dosis altes del vector als pacients.

Davant aquesta situació, en aquesta tesi hem decidit abordar aquests dos aspectes de l'actual recerca en teràpia gènica per al MNGIE. D'una banda, hem utilitzat una estratègia de millora del model animal, mitjançant l'administració crònica de nucleòsids, que accentua el seu fenotip funcional [104], per intentar demostrar que la teràpia gènica no només millora el fenotip bioquímic de la malaltia, sinó que també pot demostrar *in vivo* potencial de millora clínica. D'altra banda, hem buscat una seqüència optimitzada del gen *TYMP* que maximitzi la seva expressió i que també redueixi els seus riscos immunològics.

## **6.1. EFECTE DE L'EXPOSICIÓ A NUCLEÒSIDS EN EL MODEL dKO**

Quan es va generar el model animal de MNGIE, inicialment es va descriure l'existència d'una sèrie de desajustos bioquímics que consistien en la falta d'activitat TP (excepte en fetge on queda una activitat residual degut a l'expressió del gen *Upp2*), una acumulació moderada de nucleòsids a nivell sistèmic, i un petit desequilibri en el *pool* de dNTPs. A més d'aquests desequilibris bioquímics, es van observar alteracions moleculars i signes de disfunció mitocondrial com ara depleció d'ADNmt en cervell, deficiències en la cadena respiratòria i encefalopatia. Tot i això, llevat dels desequilibris bioquímics que són clars i sostinguts durant tota la vida dels animals, els altres trets fenotípics més funcionals (que poden modelitzar millor la presentació de la malaltia) eren molt subtils i només apareixien en ratolins molt vells [60]. De fet, són trets tan elusius que els mateixos ratolins no presentaven aquests trets fenotípics funcionals en el nostre grup de recerca [97,104], la qual cosa és probablement deguda a diferents condicions de la colònia (alimentació, localització, entre altres possibles condicionants ambientals. I, en tot cas, el model no reproduïx altres trets característics de MNGIE, com ara les alteracions gastrointestinals o el fenotip muscular i neuropatia perifèrica.

Un dels motius que pot justificar la falta de fenotip del model podria ser que l'acumulació sistèmica de dThd i dUrd en ratolins dKO no arriba a ser tant acusada com en humans on es passa de nivells indetectables d'aquests metabòlits en plasma de persones sanes ( $<0.05 \mu\text{M}$ ), a nivells típicament d'entre 3 i  $25 \mu\text{M}$  [54]. Mentre que en els ratolins d'acord amb el que s'havia observat anteriorment [99,100], els nivells de dThd i dUrd en plasma en condicions normals ja es troben al voltant de  $2-5 \mu\text{M}$ , i els del dKO es van situar aproximadament 3 vegades més alts [98]. Per tant, en humans s'observen acumulacions de nucleòsids plasmàtics de més 500 vegades els nivells WT, per només 3 vegades en els ratolins.

A l'any 2014 es va publicar un model millorat que consisteix en l'exposició crònica del model dKO a dThd i dUrd, subministrant-los a l'aigua de beguda, el qual reproduïx alguns trets fenotípics clínics similars als pacients [104]. Això ens va proporcionar una eina per ampliar els nostres estudis preclínic de teràpia gènica pel MNGIE amb rAAV dirigits al fetge, i aportar resultats addicionals de la seva eficàcia més enllà de la restitució de l'equilibri bioquímic. Com ja s'havia observat prèviament [104], l'administració oral crònica de dThd i dUrd agreuja l'acumulació sistèmica d'aquests nucleòsids a plasma i a diversos teixits, com al fetge, al cervell i a l'intestí prim, sent aquest darrer on vam observar les majors concentracions. No obstant, l'increment provocat per la sobreexposició a nucleòsids no arriba als nivells anteriorment observats [104]. En el nostre cas, els nivells de nucleòsids en fetge i cervell de ratolins dKO exposats estaven al voltant de 10 vegades la concentració dels WT i al voltant de 300-500 vegades en intestí, en front dels increments reportats a l'article original de 800 vegades en fetge, 80 en cervell i 2.000 en intestí [104]. Una altra diferència que vam observar respecte la publicació original és que nosaltres vam poder detectar nivells de dThd i dUrd en tots els teixits analitzats de ratolins WT. Aquestes discrepàncies es podrien deure al fet que durant el processament de la mostra per la determinació dels nucleòsids, nosaltres hem utilitzat inhibidors de l'activitat timidina fosforilasa (TPI en el cas del fetge i 5-amino-6-bromouracil en el cas de l'intestí prim) per prevenir la degradació *in vitro* que pugui tenir lloc.

En pacients de MNGIE, l'increment sistèmic de dThd i dUrd provoca un desequilibri del *pool* de nucleòtids mitocondrials que consisteix en l'increment de la concentració de dTTP i la depleció del dCTP i que finalment es provoca mutacions puntuals,

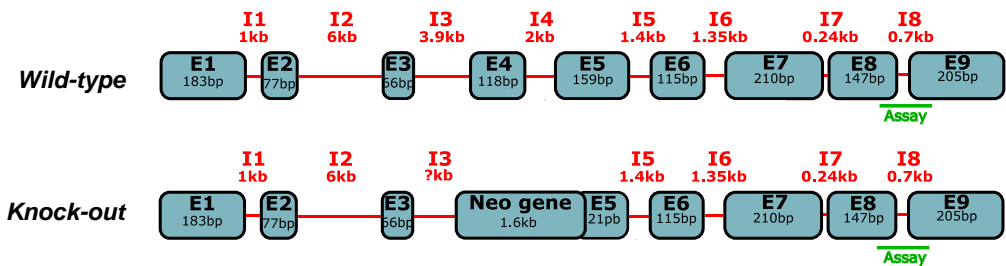
delecions múltiples i depleció en l'ADNmt [63]. En el cas del model dKO, l'exposició a nucleòsids en ratolins dKO va provocar un increment en la concentració del *pool* de dTTP mitocondrial (fetge i cervell) i una disminució del *pool* de dCTP mitocondrial (fetge), imitant els desajustos bioquímics presents en els pacients de MNGIE. A més, els nivells de dThd hepàtics i cerebrals van correlacionar amb el desequilibri del *pool* de nucleòtids mitocondrials observats en aquests teixits. No obstant, no vam observar una depleció de l'ADNmt en cervell, probablement degut a que tampoc no observàvem de depleció del dCTP en aquest teixit, ja que ambdues s'observaven en la descripció del model [104], i s'ha relacionat la disminució del *pool* de dCTP induïda per l'excés de dThd amb la depleció de l'ADNmt en pacients de MNGIE [63].

Un altre efecte prèviament no descrit que vam detectar derivat de l'exposició a nucleòsids és que provocava un increment de l'activitat TP en fetge, tant en ratolins WT com en ratolins dKO. Tot i així, sí que s'ha descrit que en cultius de cèl·lules humanes pot haver-hi un increment de l'expressió de TP induït per l'exposició a dThd o a anàlegs de nucleòsids com l'AZT [220]. En animals WT, l'activitat TP en fetge es va triplicar degut a l'exposició a nucleòsids. Per a intentar determinar si l'origen de l'increment en l'activitat TP es devia a una regulació transcripcional, vam determinar els nivells d'ARNm dels gens que poden donar lloc a una activitat TP.

En ratolins hi ha tres enzims amb activitat timidina fosforilasa: l'enzim TP, codificat per *Tymp*, i les isoformes 1 i 2 de l'enzim UP, codificades pels gens *Upp1* i *Upp2*. No vam observar que els nivells d'ARNm de cap dels 3 gens variessin degut a l'exposició a nucleòsids en els ratolins WT. Per altra banda, els gens *Tymp* i *Upp1* es troben inactivats els ratolins dKO, de manera que l'augment de l'activitat TP (8 vegades superior a la dels dKO no exposats) només es pot donar a costa de la isoforma 2 de la UP, codificada per *Upp2*. No obstant, en aquest cas tampoc vam observar un increment dels nivells d'ARNm d'*Upp2*. En els ratolins dKO no vam detectar l'ARNm de *Tymp*, ja que la modificació genètica en aquest gen, que consisteix en una inserció de 34 pb al exó 4, genera un canvi de marc de lectura que provoca l'aparició d'un codó stop 12 aminoàcids després donant lloc un ARNm susceptible de ser degradat amb el mecanisme de *nonsense mediated decay* [221].

Curiosament, vam observar que els nivells d'expressió del gen *Upp1* en ratolins dKO eren de 4 vegades els nivells dels WT, independentment de l'exposició a nucleòsids.

L'ARNm d'*Upp1* no sembla ser subjecte del mecanisme de *nonsense mediated decay* i no ho vam poder comprovar si l'ARNm resultant és susceptible de ser-ho ja que no disposem de la seqüència del gen KO. En l'article on es va generar el model KO per *Upp1* no es descrivia detalladament la modificació [103] i per tant vam intentar seqüenciar el gen. Vam observar que l'exó 5 estava interromput per inserció el gen de resistència a la neomicina sota l'acció d'un promotor de la fosfoglicerat quinasa 1 però no vam poder definir quin seria l'ARNm transcrit resultant (**Figura 6.1**). Com que la sonda predissenyada que vam utilitzar per a mesurar els nivells d'ARNm d'*Upp1* està situada en una zona del gen on no hi ha la modificació, vam ser capaços de detectar l'ARNm transcrit a partir del gen modificat per qPCR i no podem descartar que l'increment de 4 vegades que es tracti d'un mecanisme compensatori del propi dKO. Tot i que s'incrementi 4 vegades l'expressió d'*Upp1*, estaríem dirigint l'expressió d'un gen incomplet i per tant, no tindria cap efecte sobre els nucleòsids ni el model.



**Figura 6.1. Gen *Upp1* de ratolí.** Gen *Upp1* WT a dalt i gen *Upp1* KO a sota.

Com que no vam observar diferències a nivell transcripcional que expliquessin l'increment d'activitat TP en els dKO, vam intentar de trobar l'explicació en canvis d'expressió a nivell post-transcripcional d'UP2 determinant els nivells proteïna mitjançant *western-blot*. No hi ha cap anticòs contra UP2 monoclonal disponible al mercat, i per aquesta raó vam utilitzar un anticòs monoclonal contra UP1 aprofitant l'alta homologia que presenten aquestes dues proteïnes (64%). L'anticòs que vam utilitzar va resultar inespecífic ja que observàvem banda en tots els grups d'animals, incloent els dKO no exposats.



No estan descrites modificacions posttraduccional sobre la proteïna TP. La TP no està glicosilada i tot i que té una seqüència consens de fosforilació de la proteïna quinasa C, s'ha observat que *in vivo* no es fosforila [222]. Recentment, s'ha descrit que la dThd en excés podria inhibir la degradació mediada per ubiquïtines de la TP, ja que s'ha observat aquest fet en cultius cel·lulars de reticulòcits humans en diferenciació [223]. Aquest podria ser un mecanisme que justifiqui l'augment d'activitat TP en els WT. En el cas del dKO, podria ser que actués algun mecanisme similar per la UP2, ja que necessàriament, l'increment d'activitat TP s'ha de deure a un increment d'UP2.

Un dels trets més característics dels pacients de MNGIE és que desenvolupen leucoencefalopatia en la ressonància magnètica de cervell [11], però aquest tret pràcticament no s'observava en ratolins dKO. En aquest sentit, l'interès del model exposat rau en el fet que, d'acord amb el que es mostra en l'article original que descriu l'efecte de l'administració crònica de nucleòsids [104], esperaríem que els ratolins dKO exposats presentessin fenotip cerebral i intestinal [104]. A diferència de l'estudi original, els ratolins dKO exposats no exhibien fenotip intestinal en els nostres experiments (discutit més endavant). Tampoc no hem detectat diferències consistents d'hiperintensitat en parènquima cerebral en imatges obtingudes per MRI ponderades en T2 entre WT i dKO. Tot i així, l'administració crònica de dThd i dUrd sí que va provocar el desenvolupament d'un fenotip cerebral observable per MRI, tot i que, a diferència del que es va publicar anteriorment, les nostres alteracions no es trobaven en la zona parenquimatosos sinó en els ventricles cerebrals. Concretament, les anàlisis combinades de mapes de T2 i d'imatges d'alta resolució ponderades en T2 ens van mostrar que les zones hiperintenses coincidien amb les regions corresponents als ventricles laterals i al tercer ventricle, com les regions que es veien afectades en l'estudi original [104], i s'observava un augment del volum dels ventricles, però sense transferència de líquid cefalorraquidi a la zona periventricular, cosa que sí s'observa en altres models de hidrocefàlia més servers [224].

El fenotip neuromuscular dels ratolins dKO exposats es completava en la publicació original amb un deteriorament de la funció neuromuscular, un deteriorament de la capa muscular de l'intestí prim, així com una disminució de la supervivència dels animals [104]. Vam utilitzar el test Rotarod per avaluar la funció neuromuscular [225].

Aquest sistema s'ha utilitzat per avaluar la coordinació i la funció motora en altres models de malalties neuromusculars, com per exemple la malaltia de Pompe [225] i en la descripció d'aquest model s'havia observat que els ratolins dKO exposats tenien temps de latència menors que els ratolins WT [104]. En el nostre estudi els ratolins dKO exposats també presentaven un temps de latència en el Rotarod menor que el dels WT a les 25 setmanes d'edat, la qual cosa indica un deteriorament de la funció neuromuscular i de la coordinació. A més, aquest valor va correlacionar amb el volum dels ventricles a les 84 setmanes, associant la hidrocefàlia amb defectes en la funció motora. No obstant, una de les limitacions d'aquest mètode és que el pes dels animals pot influir en els resultats d'aquest test, i això impedeix realitzar aquesta prova en els animals més vells, que són els que presenten les alteracions per MRI, ja que a edats avançades els ratolins arriben a pesar al voltant de 50 g.

A diferència de l'observat en l'estudi original [104], nosaltres no vam detectar ni una disminució de la supervivència dels animals ni disminució del seu pes. És difícil explicar aquestes diferències respecte la descripció original del model, possiblement es degui a una sèrie de factors difícilment controlables. L'estabulació dels ratolins es va fer en ambients diferents en els dos estudis (diferent estabulari, diferent model i materials de gàbia i molt probablement diferent alimentació) i condicions intrínseques de la colònia (un possible biaix genètic entre la colònia WT i la dKO que és difícil d'evitar en un model doble KO). De fet, aquest fenotip és elusiu inclús en l'article on es descriu el model dKO millorat, ja que les diferències de pes observades als 17 mesos, es perden als 21 mesos [104]. En el nostre cas, quan vam comparar el pes dels animals a les 75 setmanes (en aquest punt tots els ratolins es trobaven en moments previs a la MRI) tampoc vam observar diferències entre els diferents grups.

Pel que fa al fenotip intestinal, vam observar una lleugera depleció en el número de còpies d'ADNmt en aquest teixit (estadísticament significativa, però de magnitud molt discreta). En canvi, l'anàlisi histoquímica no va revelar diferències en la presència de col·lagen en la capa muscular de l'intestí prim entre els diferents grups, indicant que l'exposició a nucleòsids no provocava dany tissular a aquest nivell. La disminució en el número de còpies d'ADNmt es va detectar en homogenat de teixit intestinal (prim) total, que barreja les diferents capes anatòmiques, però no sabem si la depleció es

concentra en les capes musculars de l'intestí, que és on s'ha observat en necròpsies de pacients [26,27]. I també és on es va observar acumulació de col·lagen en la descripció original del model [104].

Com a resum general d'aquesta part, podem concloure que l'exposició a nucleòsids reforça el fenotip bioquímic i neuromotor del model murí dKO de MNGIE. Les nostres observacions en aquest sentit en gran mesura consistents amb els resultats publicats [104], tot i que una part dels efectes reportats en l'estudi inicial no va ser replicada en el nostre estudi, probablement degut a un canvi de les condicions ambientals d'estabulació i de deriva temporal en la colònia de ratolins (probablement genètica). Tot i així, es tracta d'un bon model per observar si el tractament amb rAAV és capaç de corregir o prevenir el fenotip.

## 6.2. TERÀPIA GÈNICA EN EL MODEL dKO EXPOSAT

L'elecció del fetge com a teixit diana per a la teràpia gènica del MNGIE és deguda tant a les característiques de la malaltia, com a les característiques del propi òrgan. El MNGIE és una malaltia provocada per l'acumulació sistèmica de dThd i dUrd, que es tracta de molècules petites no iòniques que difonen a través de les membranes cel·lulars a través de transportadors específics. Per tant, no hi ha un teixit diana concret que els hagi d'eliminar, mentre s'eliminin a nivell sistèmic. En quant al fetge, com ja s'ha comentat en la introducció, és un teixit molt interessant a nivell de teràpia gènica basada en rAAV degut al tropisme natural dels serotips [153], a l'alta taxa de transducció dels hepatòcits, a que es tracta d'un teixit quiescent [163] i a que és capaç d'induir tolerància del transgèn a nivell immunitari [164].

Per aquesta raó, a part d'escollir el serotip 8, que presenta un tropisme natural al fetge, la majoria dels vectors que hem estudiat fins al moment contenen promotors dirigits al fetge. En concret hem provat 2 promotors hepàtics: el TBG, i el casset ApoE-AAT, *enhancer*-promotor (o la seva versió reduïda HLP) [226]. El casset ApoE-AAT s'ha utilitzat en diversos estudis basats en AAV [227,228]. Tots els vectors van ser efectius en produir una millora bioquímica eficient tot i que el vector amb l'AAT va ser el que va induir una major activitat TP en fetge i la normalització dels nucleòsids a la dosi més baixa en el model dKO [100]. També vam testar si la conformació auto-complementària del vector aconseguia una expressió més alta i

ràpida, tal i com està descrit [170] i no vam observar aquesta millora. Addicionalment, i amb l'objectiu d'expandir l'expressió de TP a altres teixits vam utilitzar un promotor constitutiu, el hPGK (promotor de la fosfoglicerat quinasa), tot i que tampoc va resultar amb una millora en comparació a l'efecte observat amb els promotors hepàtics [100]. En aquest estudi, hem aprofitat la disponibilitat d'un model millorat de la malaltia per a corroborar la viabilitat de la teràpia gènica pel MNGIE i si algun d'aquests constructes és capaç de prevenir el fenotip neuromuscular observat en els ratolins dKO exposats a sobrecàrrega de nucleòsids.

### 6.2.1. RESTAURACIÓ DE L'ACTIVITAT TP EN EL MODEL DE RATOLÍ

L'administració d'una sola injecció intravenosa dels diferents vectors AAV8 va resultar en un increment de l'activitat TP i del VCN en fetge. En tots els rAAVs, aquests dos paràmetres augmentaven de manera dosi dependent, però aquest increment no va ser lineal.

Els valors de VCN obtinguts en aquest estudi s'ajusten als VCN publicats per altres autors [229,230] i per nosaltres mateixos [99]. En aquest estudi, a la dosi més baixa, vam poder determinar un increment tant en el VCN com en l'activitat, cosa que no havíem observat en l'estudi anterior (on la dosi més baixa testada era inferior que en el nostre cas) [100]. També hem observat com la correcció bioquímica es manté durant tota la vida del ratolí en els animals tractats amb rAAV (consistent amb els resultats de l'estudi anterior [99]), tot i que anteriorment també havíem observat una lleugera dilució tant del VCN com de l'activitat TP en els animals vells, que també és esperable en el nostre cas. Pel que fa a la comparació entre vectors, no vam observar diferències significatives entre el VCN de cap dels vectors a les dosis de  $2 \cdot 10^{12}$  i  $10^{13}$  vg/kg (que eren les dosis en les podíem comparar els 3 vectors).

Quan vam comparar els valors d'activitat TP normalitzats per VCN vam observar que aquests disminuïen a mesura que augmentava la dosi. Addicionalment, quan vam fer una representació XY dels valors d'activitat en funció del VCN, els punts s'ajustaven a una corba semilogarítmica. Per tant, tots aquests paràmetres ens indiquen que vam tenir un efecte de saturació a mesura que augmentava la dosi. Aquest fenomen, on a mesura que s'augmenta la dosi la quantitat de transgèn normalitzada per còpia del vector disminueix, ja l'havíem observat anteriorment en

estudis nostres anteriors amb els mateixos vectors [100] i també s'havia observat en altres estudis per l'hemofília (on utilitzaven aquest mateix serotip (AAV8) per a transduïr el fetge amb transgèn sota el control dels promotors hepàtics HLP o LP1) [158,229]. Una explicació podria ser, tal i com s'ha proposat en aquests estudis esmentats, que la presència de múltiples còpies dona lloc a la formació de concatèmers i així promou una disminució de l'expressió del transgèn via *repeat-induced gene silencing* [231]. Aquest és un mecanisme epigenètic que podria constituir una resposta contra les infeccions virals, on normalment diverses còpies del virus entren a una mateixa cèl·lula, i s'ha observat que està present en fongs, plantes, *Drosophila*, nematodes, mamífers i cèl·lules humanes en cultiu [232].

L'anàlisi del ràtio activitat TP entre VCN va indicar que l'AAV-AAT era el vector més eficient, ja que és el vector que amb el mateix número de còpies és capaç de donar lloc a una activitat TP més alta. Tots aquests resultats reforçaven els nostres resultats previs on havíem vist que a curt termini, el vector AAV-AAT també era el més efectiu [100].

Està descrit que la conformació auto-complementària dona lloc a una expressió més ràpida i eficient del transgèn [170]. No obstant, en el nostre cas, la utilització d'un scAAV no va comportar un increment de la taxa de transducció si ens fixem amb el VCN, i tampoc ho havíem vist anteriorment [100]. A més, un dels avantatges de l'ús del scAAV és que pot conduir a una expressió més ràpida del transgèn, cosa que tampoc vam veure en un estudi anterior, on el vector que reduïa els nucleòsids en plasma de manera més ràpida va ser l'AAV-AAT [100]. Una possible explicació de la falta d'eficiència del scAAV és que també està descrit que aquesta conformació promou una activació més alta de la resposta immunitària innata via TLR9, conduint a una eliminació del vector [174].

Els valors d'activitat obtinguts en tots els vectors en totes les dosis van superar els valors d'activitat TP de fetge dels animals WT, arribant a multiplicar aquest valor per 53 en el cas de l'AAV-TBG, per 75 amb el vector AAV-AAT i per 40 amb l'AAV-HLP, quan els ratolins dKO van ser tractats amb la dosi més alta. A més, en el nostre cas, aquesta sobreexpressió no es va traduir en un efecte invers en el *pool* de dTTP en el fetge, ja que els ratolins tractats amb rAAV recuperen valors de dTTP típics d'animals WT. En un estudi anterior, on vam observar una reducció dels nivells de

dTTP deguda al tractament amb rAAV, aquesta disminució no es va traduir en una depleció de l'ADNmt en fetge [100].

Tot i així, que s'obtinguin activitats TP més altes que la WT no seria un problema, ja que comparat amb un fetge humà (1.600-2.000 nmols Thy/h · mg prot) [55], un fetge de ratolí WT presenta una activitat TP bastant inferior. A més, està reportat que la transducció amb rAAV del fetge de ratolins és 20 vegades superior a la transducció dels hepatòcits humans [233,234] el que fa pensar que aquesta expressió de TP no seria tant alta en persones.

A més, en una futura aplicació de la teràpia gènica en humans, és esperable que es necessitin activitats TP més altes que les d'un fetge sa per a restituir la homeòstasi bioquímica. Ja que la concentració de dThd i dUrd en plasma després d'un transplantament hepàtic no disminueix a valors indetectables de persones sanes en tots els casos [89,91] i per exemple, en els 2 casos de transplantament de fetge de pacients de MNGIE en el nostre hospital, la concentració plasmàtica de dThd i dUrd en els pacients trasplantats es manté entre 0,3 i 1,0  $\mu$ M (dades nostres no publicades). La sobreexpressió del gen podria ser més greu si es tractés d'una teràpia gènica dirigida a un altre òrgan, per exemple el múscul esquelètic, on s'han reportat altes respostes immunes contra el transgèn [235–237]. No obstant, el fetge és un òrgan capaç d'induir tolerància específica al transgèn, un efecte que s'ha descrit que està mediat per les cèl·lules T reguladores [238–240]. Totes aquestes raons fan pensar que aquesta sobreexpressió de TP no seria preocupant en la translació d'aquesta teràpia en humans quan es dirigeix al fetge.

Els nostres vectors estan pseudotipats amb la càpsida de l'AAV8, que injectat via intravenosa transdueix majoritàriament el fetge [153]. A més, els tres cassets d'expressió tenen especificitat hepàtica, tot i que l'AAT (i el HLP, donat que es tracta d'una versió reduïda de l'AAT) també pot induir un cert grau d'expressió en altres teixits com ronyons, estómac, pàncrees, cervell, ovaris i timus [229,241,242].

El cervell i el múscul esquelètic són dos teixits que en animals WT presenten una activitat TP molt baixa i en animals dKO una activitat TP indetectable. El tractament amb rAAV no va provocar un augment d'activitat en aquests teixits excepte en alguns casos puntuals, cosa que ja havíem vist anteriorment [100]. En canvi en el cas de

l'intestí prim, sí que vam observar de manera consistent un increment d'activitat TP que augmentava amb la dosi en els 3 vectors. Tot i així, com que l'intestí en ratolí és un dels òrgans que presenta una activitat TP més alta, no vam arribar a valors WT en cap dels ratolins dKO tractats. Com que s'ha reportat expressió il·legítima d'aquests promotors en teixits no hepàtics [229,241,242], en tots els ratolins i teixits on puntualment es van assolir valors d'activitat superior al rang d'activitat TP dels animals dKO en aquell teixit vam intentar determinar per qPCR la presència tant de l'ADN del vector, com de l'ARNm resultant de la seva transcripció. No obstant, i també de manera anàloga al que havíem observat anteriorment [100], no vam ser capaços de veure una transducció fora del fetge en cap cas a nivell d'ADN. En canvi, a nivell d'ARNm en algun cas vam poder observar nivells detectables de la transcripció del vector, tot i que no de manera consistent, ja que no correlacionava amb aquells teixits i animals on l'activitat TP era més alta. La presència de TP en teixits no hepàtics (o d'ARNm que codifica per la TP) podria explicar-se per una exportació d'exosomes des del fetge en forma d'ARNm o proteïna [243]. Els exosomes són vesícules extracel·lulars que s'utilitzen com a vehicles per la comunicació entre cèl·lules, i per intercanviar compostos, incloent àcids nucleics i proteïnes [244]. I concretament, ja s'ha observat que la TP pot estar present en exosomes derivats de plaquetes, del tim i de cèl·lules de càncer de nasofaringe [245]. En el nostre cas, els resultats obtinguts es podrien explicar per una barreja d'exosomes contenint o bé ARNm o bé proteïna directament. En tot cas, l'activitat extra hepàtica es troba en casos aïllats, i és tan baixa que no té cap rellevància funcional en el context d'aquest treball.

### **6.2.2.RESTAURACIÓ DE L'HOMEÒSTASI BIOQUÍMICA**

En tots els treballs de teràpia gènica del MNGIE mediada per rAAV publicats fins ara, l'eficàcia del tractament s'ha avaluat en base a la seva capacitat de reduir les concentracions de nucleòsids en ratolins dKO, tot i que les acumulacions són molt petites comparades amb pacients [98–100]. A més, és difícil poder establir un efecte dosi dependent, ja que a partir d'una mateixa dosi no es veu una major reducció de nucleòsids. Amb el model de sobrecàrrega esperàvem poder detectar quines dosis produïen reduccions similars a les necessàries en pacients tot i que vam trobar alguns problemes.

En la caracterització inicial del model dKO amb sobrecàrrega de nucleòsids es va mesurar la concentració de dThd i dUrd en mostres de necròpsies únicament a punt final, mostrant una elevada variació en la concentració d'aquests nucleòsids, sobretot en alguns teixits com l'intestí prim [104]. Al nostre estudi hem intentat fer un seguiment *in vivo* al llarg del temps de la concentració plasmàtica d'aquests nucleòsids per monitoritzar l'efecte del tractament i hem detectat que la via de sobreexposició a nucleòsids no permet mantenir uns nivells de dThd i dUrd constants. Com vam veure en els estudis de farmacocinètica la concentració de dThd i dUrd en plasma augmenta ràpidament després d'una administració oral d'aquests nucleòsids, però també disminueix ràpidament, amb tota probabilitat degut a excreció urinària, ja que s'ha vist en pacients i en algunes mostres d'orina de ratolí que es poden excretar concentracions fins i tot 100 vegades superiors a les observades en la sang [67,68]. Donat que el suplement de dThd i dUrd es dona a través de l'aigua de beguda, de la que disposen *ad libitum*, els nivells de nucleòsids circulants depenien en gran mesura de quan cada animal havia fet la darrera ingesta d'aigua abans de l'extracció de la mostra. Les ingestes d'aigua dels ratolins normalment ocorren durant la nit, coincidint amb el seu període de màxima activitat dels ratolins. Tot i que posteriorment vam poder reduir la variabilitat d'aquests resultats controlant l'hora de l'extracció de sang, limitant-la a entre les 8 i les 9 del matí, els resultats obtinguts seguien sent dispersos degut a la dificultat de controlar l'última ingesta de cada ratolí, la qual cosa limitava la nostra capacitat d'avaluar l'efecte del tractament.

Això ens va fer introduir un experiment d'estudi farmacocinètic de la dThd i dUrd, per tal de determinar d'una manera controlada certs paràmetres que es poguessin prendre com a indicadors de la potència *in vivo* de cada tractament amb AAV. Els resultats van mostrar una clara resposta al tractament amb rAAVs dels tres paràmetres farmacocinètics estudiats (pic de concentració, àrea sota la corba, i temps per assolir les concentracions de WT) d'una forma dosi-depenent. El vector més efectiu per reduir els nivells de nucleòsids en plasma va ser l'AAV-AAT. Aquest fet coincidia amb que l'AAV-AAT, també va ser el vector que va proporcionar una activitat TP més alta en fetge així com una normalització dels nivells de nucleòsids i dNTPs en els diferents teixits.



La major acumulació de nucleòsids es va observar, d'acord amb el que s'havia reportat anteriorment [104], en l'intestí prim, probablement degut a la presència dels nucleòsids ingerits que encara no han passat a la sang. Una de les limitacions del nostre tractament, va ser que no vam aconseguir reduir les concentracions de nucleòsids en aquest teixit, probablement degut a que la nostra teràpia esta dirigida al fetge i en l'intestí prim, els nucleòsids acaben de ser ingerits encara no han estat incorporats a l'espai vascular ni han passat pel fetge, i per tant, l'efecte catabòlic de la TP introduïda a través del transgèn no els pot afectar. Ja havíem observat anteriorment que amb el tractament amb rAAV no aconseguíem una restauració completa als nivells WT de dThd i dUrd en l'intestí prim [100]. Aquest fet es veu agreujat en el nostre model amb sobrecàrrega ja que contínuament els ratolins estan ingerint nucleòsids en altes concentracions. Malgrat això, aquest fet no va provocar en el nostre cas un dany en la capa muscular de l'intestí, al contrari del que es va observar anteriorment en aquest model [104] i com s'observa en els pacients de MNGIE [26,27]. El nostre estudi histoquímic d'aquest teixit no ens va permetre observar un increment de la fibrosis en aquesta regió.

Els desequilibris en els dNTPs mitocondrials induïts per la sobrecàrrega de nucleòsids típics del MNGIE es van corregir en fetge com a conseqüència del tractament amb rAAVs. És a dir, l'increment del dTTP i la depleció del dCTP provocats per l'exposició a nucleòsids es va corregir majoritàriament amb el tractament, tornant en la majoria de casos a valors WT. Tot i així l'increment de dGTP degut a sobrecàrrega de dThd i dUrd no es va reduir amb cap vector ni dosi. Desconeixem, a què es deu aquest desequilibri de dGTP ja que la síntesi del dGTP en principi, no està directament relacionada amb el metabolisme de les pirimidines. No obstant, l'expansió del *pool* del dGTP també s'ha observat en els animals WT tractats amb sobrecàrrega tant d'aquest estudi com en la descripció original del model [104], en altres estudis amb el model dKO [92,97], i en estudis *in vitro* amb la línia cel·lular Hela [246]. En cervell en canvi, només vam observar diferències en el dTTP que es van corregir parcialment amb el tractament. El fet que la diana de la nostra teràpia sigui el fetge pot ser una raó dels efectes moderats observats en cervell. A més, nosaltres vam tractar el cervell com un tot a l'hora de mesurar els dNTPs i així pot emascarar efectes locals en diferents estructures del cervell.

### 6.2.3. RESTITUCIÓ DEL FENOTIP NEUROMUSCULAR I RADIOLÒGIC.

Tal i com s'ha discutit anteriorment en l'apartat 6.1, l'exposició a nucleòsids va provocar en els ratolins un fenotip neuromuscular i radiològic que presenta algunes semblances a alguns trets fenotípics observats en els pacients de MNGIE. Gràcies a això vam poder demostrar per primera vegada que la teràpia gènica utilitzant rAAV també era capaç de prevenir els trets fenotípics no purament bioquímics que presenta aquest model millorat. Els ratolins dKO exposats a dThd i dUrd tractats amb els vectors AAV-HLP i AAV-AAT van restituir el volum normal dels ventricles cerebrals en la MRI, i aquest efecte també es va observar parcialment amb el vector AAV-TBG (encara que no estadísticament significatiu). A més, si agafem tots els ratolins, la concentració de dThd en cervell i el volum del ventricle correlacionen, reforçant la idea que la normalització bioquímica està relacionada amb una normalització del fenotip radiològic cerebral.

Els resultats obtinguts amb el test de Rotarod sobre la funció neuromuscular apunten també a una recuperació del fenotip neuromuscular, tot i que aquesta normalització només va ser estadísticament significativa amb l'AAV-TBG  $10^{12}$  vg/kg i AAV-HLP  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg. No obstant, gran part dels ratolins recuperen valors a dins del rang dels WT i és la dispersió dels resultats el que impedeix observar diferències significatives. Com ja s'ha comentat anteriorment, una de les limitacions d'aquesta prova és la dispersió provocada per la diferència de pes entre ratolins cosa que no permet repetir la prova en ratolins més vells, quan l'efecte de la sobreexposició a nucleòsids es fa més evident i quan s'observen les alteracions dels volums ventriculars cerebrals.

Creiem que és important destacar aquí que, més que la magnitud de les correccions observades (sobre un fenotip induït que segueix sent discret), l'important és mostrar que la teràpia gènica està alterant el curs fenotípic del model en la seva vessant "clínica". La demostració que aquesta teràpia normalitza l'homeòstasi bioquímica dels nucleòsids ha estat demostrada abastament en anteriors estudis del nostre grup (totes les nostres referències d'articles experimentals de teràpia gènica). Però aquesta restitució bioquímica és esperable ja que estem proporcionant un enzim que catabolitza els nucleòsids dThd i dUrd. En canvi, no és tan directe esperar que la teràpia tingui un efecte beneficiós sobre trets que modelitzen, tot i que només parcialment, alguns símptomes clínics dels pacients, i aquí ho hem pogut demostrar

per primera vegada per a un rAAV dirigit al fetge, i està d'acord amb estudis que observen efectes similars amb un vector lentiviral dirigit al teixit hematopoètic [208].

Fins ara, les úniques teràpies aplicades a pacients que han mostrat una correcció bioquímica a llarg termini són els transplantaments de cèl·lules mare hematopoètiques i el transplantament de fetge. A més, en alguns casos, s'han observat millores també en els símptomes clínics sobretot a nivell neuromuscular [66,77]. Els resultats preclínics obtinguts en aquesta tesi indiquen que una teràpia gènica basada en rAAV dirigida al fetge podria tenir potencial també per canviar el decurs de la malaltia en els pacients, amb els avantatges de seguretat que presenta aquest tractament en comparació amb els transplantaments, que són tractaments complexos, més difícils i molt més agressius.

### **6.3. OPTIMITZACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA CODIFICANT DE *TYMP***

Com ja hem vist, els vectors de teràpia gènica s'han de millorar i optimitzar en tots els seus elements ja que són moltes les barreres que han de superar per aconseguir una expressió terapèutica del seu transgèn. És per això que la millora dels rAAV és un aspecte molt necessari abans de la translació dels estudis preclínics a la practica clínica degut a diverses raons. En primer lloc, la taxa de transducció dels rAAV és més baixa en humans que en ratolins [233,234], i en segon lloc la resposta immunitària contra els rAAV és més alta en humans que en ratolins [247], cosa que pot fer que la dosi efectiva de tractament en humans hagi d'incrementar-se quan es compara amb les observacions dels estudis en models de ratolí. En conseqüència, l'optimització de tots els elements del vector tindrà un impacte tant en la seguretat del tractament com en el cost del tractament, ja que ens permetrà utilitzar dosis més baixes i facilitarà l'aplicació d'aquest tractament en pacients.

Originàriament l'optimització de codons va sorgir per a incrementar l'expressió de proteïnes recombinants en sistemes de producció heteròlegs com ara l'expressió de proteïnes humanes en *E. coli*. No obstant, cada vegada s'utilitza més per a incrementar l'expressió de vectors en la teràpia gènica, com per exemple de l'hemofília A i B [248,249], retinitis pigmetosa [250] o vacunes d'ADN [200].

La nostra aproximació va consistir a testar *in vitro* en diverses línies cel·lulars diferents modificacions de la seqüència codificant de *TYMP* utilitzant un vector

lentiviral com a eina de transducció. Vam decidir utilitzar LVs per diverses raons: en primer lloc, la millora que esperàvem depèn de la seqüència codificant, no del promotor, ni de la taxa de transducció; en segon lloc, com que ho havíem de testar en cèl·lules en divisió, l'ús de LVs, que són vectors integratius, ens permetia fer els experiments sense la interferència de la pèrdua del vector deguda a la divisió de les cèl·lules; i finalment com que volíem comparar 5 seqüències diferents, això implicava produir 5 vectors adenoassociats diferents a grans quantitats ja que típicament els AAV s'utilitzen a MOIs d'entre 10.000 fins a 100.000 per cèl·lules en cultiu [251].

En primer lloc vam optimitzar els codons de *TYMP* per a obtenir una expressió més alta. Hi ha moltes eines disponibles per a realitzar una optimització de la seqüència segons el biaix en l'ús de codó d'una espècie concreta. Concretament, nosaltres vam escollir 4 algoritmes diferents que optimitzaven diversos paràmetres importants per l'expressió de les seqüències. Els 4 algoritmes utilitzats van maximitzar el CAI ja que com més alt sigui aquest valor, més freqüents seran els codons utilitzats i per tant més ARNt disponibles tindran [183], i en tots els casos vam aconseguir una seqüència codificant amb un CAI superior a 0.9, mentre que en la seqüència no optimitzada era de 0.78. Després cada algoritme proporcionava un criteri diferent, com per exemple maximitzar l'ús de parells de codons freqüents (algoritme C) que també s'ha vist que augmenta la velocitat de traducció [184], evitar estructures secundàries de l'ARNm (algoritme B i D) ja que estructures més estables requereixen més energia per desplegar-se [188]. Tot i així, l'efecte que tindrà una modificació dels codons en una seqüència no es pot preveure, i un mateix algoritme pot donar lloc a un increment, disminució o cap canvi en l'expressió en diferents gens, inclús en gens amb CAIs similars [193]. Per tant, és necessari que un cop optimitzada la seqüència, es comprovi *in vitro* en el model més similar possible si l'optimització ha resultat efectiva. És també per aquesta raó que vam decidir provar diverses seqüències optimitzades amb diferents algoritmes.

En cas d'observar millores per a algun dels algoritmes d'optimització, per a acotar en quin punt del procés d'expressió gènica es produïa la millora vam analitzar els nivells de transducció (còpies de vector per cèl·lula), la quantitat d'ARNm de *TYMP* per qPCR, i l'activitat enzimàtica TP. Posteriorment, vam normalitzar aquests paràmetres entre ells de la següent manera: (i) ràtio activitat TP / còpia del vector

(com a mesura de millora global d'eficiència deguda a l'optimització); (ii) ràtio quantitat d'ARNm de *TYMP* / còpia del vector (com a mesura de millora en transcripció/estabilitat induïda per l'optimització); i (iii) ràtio activitat TP / quantitat d'ARNm de *TYMP* (com a mesura de millora en l'eficiència de traducció deguda a l'optimització de codons).

De les 4 seqüències optimitzades, només vam obtenir una millora global d'eficiència significativa de l'expressió de *TYMP* per còpia de vector en una, i només en una de les línies cel·lulars, quan es comparava a la seqüència WT. Concretament, l'algoritme d'optimització A, que consistia en canviar cada codó pel codó més freqüent per aquell aminoàcid, va generar una seqüència optimitzada que s'expressava 1,5 vegades més que la seqüència WT en la línia cel·lular hepàtica Huh7. En la resta de línies cel·lulars testades, aquesta mateixa seqüència optimitzada es va expressar de manera igual o lleugerament superior a la WT, tot i que no va ser estadísticament diferent.

La seqüència optimitzada A es va expressar a un nivell igual o superior que la seqüència WT en valors d'activitat per número de còpia, però observàvem diferències en funció de la línia cel·lular on ho testàvem. Tot i que totes les línies cel·lulars eren humanes i per tant podríem esperar els mateixos resultats en cadascuna de les línies cel·lulars, aquestes diferències es podrien explicar pel fet que tant el biaix en l'ús de codó [252] com la quantitat d'ARNt pot variar entre teixits [253]. Per tant, que sigui en la línia cel·lular Huh7 on observem un increment en el grau d'expressió respecte la seqüència WT és especialment rellevant ja que es tracta d'una línia cel·lular hepàtica i per tant la que més s'assembla a la nostra diana terapèutica. Tot i així no podem oblidar que la línia Huh7 és una línia immortalitzada mentre que les cèl·lules del fetge estan majoritàriament en quiescència i el patró d'expressió de gens pot variar respecte els hepatòcits primaris [254].

Posteriorment vam analitzar la informació que ens oferien els ràtios (ii) i (iii) definits més amunt, com a una mesura de l'eficiència d'expressió a nivell de transcripció o d'estabilitat de l'ARNm en el primer cas, i de traducció a proteïna en el segon, a les quals pot donar lloc l'optimització de codons [186,187]. De fet, no esperàvem una diferència en la transcripció d'aquests vectors ja que el promotor és el mateix en tots els casos, i per tant una diferència en els nivells d'ARNm per número de còpia del

vector hauria de ser degut a una major estabilitat de l'ARNm. Concretament, l'algoritme A va generar una seqüència que va obtenir un ràtio ARNm per VCN superior al WT en totes les línies cel·lulars testades. Un possible motiu de l'increment de l'estabilitat de l'ARNm és que tot i que l'optimització amb l'algoritme A no va variar el percentatge global GC de la seqüència (de 69% a 71%), sí que va augmentar el percentatge de GC en la tercera posició dels codons d'un 79% a un 93%, fet que s'ha descrit que pot donar lloc a ARNm més estables [218,255].

Com que l'optimització de codons només aconseguia una lleugera millora de l'expressió de *TYMP* i s'ha observat que un dels factors limitants més importants de la teràpia gènica en humans és la falta d'eficiència en l'expressió del transgèn degut a la resposta immune, vam modificar la seqüència per tal de que fos menys immunògena. Hi ha diversos elements del vector que poden activar la resposta immunitària, com per exemple per la pròpia seqüència d'ADN per la via de la resposta immunitària innata (via TLR9) [219]. Per aquesta raó, una de les estratègies que vam dur a terme és l'eliminació dels dinucleòtids CpG de la seqüència codificant, la qual cosa disminuiria la resposta immunitària en una futura aplicació clínica d'aquest tractament [219]. Els dinucleòtids CpG no metilats activen en sensor TLR9 i estimulen la producció d'interferó I, que a la seva vegada activa la resposta primària de cèl·lules T CD8<sup>+</sup> [256]. Vam modificar 3 de les seqüències, la seqüència WT, la seqüència obtinguda amb l'algoritme A (era la que havia funcionat millor en Huh7) i la seqüència obtinguda amb l'algoritme D (va ser en la que no s'observava una disminució en el ràtio proteïna/ARNm en algunes línies cel·lulars). La substitució dels dinucleòtids CpG per codons on aquesta seqüència no apareix afecta negativament la seva expressió i el rendiment d'activitat del producte finalment obtingut en totes les seqüències testades. No obstant, en el cas de la seqüència WT sense CpG, la disminució només és de 0,8 vegades l'expressió de la seqüència WT.

En resum, la seqüència optimitzada A va obtenir un benefici moderat de l'expressió en termes d'activitat per número de còpies (1,5 vegades més expressió que la seqüència WT). Però quan vam realitzar la segona modificació, que consisteix en eliminar els dinucleòtids CpG per a fer-la menys immunògena, sobre la seqüència optimitzada que mostrava aquest increment vam observar que es perdia l'efecte i l'expressió és reduïa a 0,5 vegades la de la seqüència WT. En canvi aquesta mateixa

modificació sobre la seqüència WT va comportar només una reducció del 20%. Les dades obtingudes fins ara, tant en models preclínic [219,256,257], com en assajos clínics [258], indiquen que el presència dels dinucleòtids CpG incrementa en gran mesura la immunogenicitat del vector. De fet, en els diferents assajos clínics referents a la teràpia gènica per l'hemofília B, aquells estudis on s'utilitzaven vectors on s'havien eliminat els dinucleòtids CpG, eren aquells on l'expressió del transgèn era més duradora [259]. En conseqüència, preveient que la seqüència codificant WT sense CpG reduirà de manera molt significativa la resposta immunitària en humans, pensem que tot i que s'observa una reducció de l'expressió al voltant del 20%, l'avantatge que l'absència de seqüències CpG aporta en termes de reducció de la resposta immunològica compensa aquesta modesta reducció de cara a l'ús clínic del vector.

## **6.4. PERSPECTIVA DE LA TERÀPIA GÈNICA PEL MNGIE EN HUMANS**

Els resultats d'aquest estudi mostren que el vector AAV-AAT és el que va obtenir els millors resultats entre els 3 que vam testar, i recolzen resultats previs, demostrant que l'AAT és el promotor més efectiu en proporcionar activitat TP al fetge, restituir la homeòstasi de nucleòsids i dNTPs. A més, per primera vegada, hem observat millores fenotípiques associades a la teràpia gènica amb AAV pel MNGIE en el model dKO exposat a dThd i dUrd. I addicionalment perduren aquests efectes perduren a llarg termini.

Amb aquests estudis, el següent pas consisteix a transferir la seqüència WT sense els dinucleòtids CpG al vector que conté el promotor de la AAT i testar-lo en el model dKO millorat. D'aquesta manera, s'ajuntarien les diverses millores observades per separat i creariem un vector optimitzat a diversos nivells que podria ser més efectiu a dosis més baixes i per tant disminuiria el cost i el risc del tractament. Finalment, si l'assaig preclínic en ratolí confirma la millora, es podria passar a la fase d'assaig clínic en pacients (tot i que abans d'aquest pas, les agències reguladores poden demanar estudis de toxicitat i biodistribució formals per assegurar l'absència de toxicitat potencial).

En aquests últims anys hem demostrat que la teràpia gènica amb rAAV dirigida al fetge resulta una estratègia prometedora per al tractament del MNGIE [97,98,100] i que permetria evitar les limitacions associades a les teràpies actuals (transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques o transplantament de fetge): risc de mortalitat degut al transplantament, dificultat de trobar un donant compatible o ús d'immunosupressors pel condicionament previ. També suposaria una reducció dels costos d'hospitalització ja que la injecció intravenosa d'un AAV pot comportar un ingrés després del tractament de només 24h [260], mentre que els pacients normalment s'han de passar més temps hospitalitzats després d'un transplantament. A més, tota l'experiència obtinguda amb la teràpia gènica per el MNGIE podria ajudar al desenvolupament d'estratègies similars per altres malalties causades per l'acumulació sistèmica de metabòlits tòxics.

Tot i així, també existeixen una sèrie de limitacions i dificultats associades a l'aplicació de la teràpia gènica en humans. La primera és referent a la seguretat de la teràpia gènica amb rAAV, però el consens actual és que els rAAV són vectors segurs. Tot i que en certs casos concrets, s'ha relacionat la integració dels rAAV amb carcinoma cel·lular hepàtic en ratolins [261,262], no hi ha cap evidència de genotoxicitat dels rAAV en el seguiment a llarg termini de pacients en assajos clínics [154].

Tot i que no era l'objectiu d'aquest treball, vam fer una observació macroscòpica al moment de la necròpsia dels principals òrgans dels ratolins. La petita mostra de ratolins d'aquest estudi ens va indicar que la incidència de tumors hepàtics en els ratolins tractats amb rAAV no va ser més alta que la dels ratolins WT o dKO sense tractar, ni diferent de les taxes descrites en altres estudis [99,156]. Addicionalment, quan vam analitzar la supervivència amb una corba de Kaplan-Meier vam observar que el tractament amb rAAV tampoc no s'associava amb una mortalitat més alta.

Un segon aspecte és com interaccionarà la teràpia amb els elements del sistema immunitari, ja que els diversos elements del vector poden provocar la seva activació [154]. Els anticossos neutralitzants contra el vector són bastant prevalents entre la població (un 40% de la població presenta anticossos anti-AAV8 [203]). Una possible solució seria tenir vectors pseudotipats amb la càpsida de l'AAV5 que s'ha observat que té una taxa de transducció dels hepatòcits similars al AAV8 [158,263], i que no



presenta reacció creuada amb els anticossos anti-AAV8 [263]. A més aquest serotip ja s'ha utilitzat en altres assajos clínics de teràpia gènica dirigida al fetge, per exemple per l'hemofília A, B o la porfíria [260,264,265].

Un altre aspecte de la immunitat preocupant és la pèrdua d'expressió del transgèn a llarg termini, que pot ser deguda a la immunitat contra el producte dels transgèn i/o l'eliminació de les cèl·lules transduïdes. En el primer cas, el fetge representa un ambient immunotolerant, gràcies a l'acció de les cèl·lules T reguladores [164], que permet desenvolupar tolerància contra el transgèn [266], com s'ha observat en els assajos clínics contra l'hemofília, on no s'han detectat anticossos contra el factor IX [172,267]. La càpsida dels AAV pot desencadenar una resposta dosi dependent que pot eliminar les cèl·lules transduïdes. S'ha observat que diferents protocols d'administració de corticoesteroides modulen la resposta contra la càpsida, redueixen la presentació d'antigen de la càpsida en les cèl·lules transduïdes i permeten mantenir l'expressió del transgèn estable [154]. Addicionalment, les produccions de rAAV poden contenir impureses, com poden ser proteïnes de les cèl·lules hoste, ADN de mamífer, altres contaminants o la presència de càpsides buides, que també poden influir en la immunogenicitat del vector [154].

Finalment, tot i que s'ha observat que en ratolí, la transducció hepàtica dels rAAV és major en mascles que femelles [268,269], anteriorment vam tractar un petit grup de ratolins femelles dKO amb l'AAV-TBG i vam observar que el tractament era efectiu en els dos sexes [99]. A més, és important destacar que en estudis en primats no humans i en pacients no s'ha observat aquesta transducció diferencial entre sexes [270], pel que *a priori* no caldria tenir-ho en compte en el cas d'un futur assaig clínic.

El MNGIE és una malaltia ultra-minoritària, amb una prevalença estimada de 1 cas per cada 10.000.000 persones (observacions del nostre grup de recerca contrastades amb altres col·legues internacionals). Degut als pocs pacients, és difícil trobar fonts de finançament que permetin intentar testar l'eficàcia d'aquest tractament en un assaig clínic, ja que les companyies farmacèutiques veuen poc marge de recuperació dels diners invertits. En aquest sentit, hem obtingut la designació de medicament orfe pel vector AAV-TBG (que va ser el primer que es va testar) per l'Agència Europea del Medicament i per la *Food and Drug Administration* a Estats Units. Actualment, estem intentant trobar fonts de finançament per dur a

terme un assaig clínic de fase I i II en pacients de MNGIE. Creiem que és important seguir buscant alternatives de finançament per aquest assaig clínic que permeti demostrar l'efectivitat de la teràpia gènica, ja que els únics tractaments actuals són tractament agressius i limitats, i per tant creiem que aquesta teràpia alternativa tindria una bona acceptació entre els pacients.



## **7. CONCLUSIONS**

---



1. L'administració oral crònica de timidina i desoxiuridina als ratolins doble *knock-out* *Tymp<sup>-/-</sup>/Upp1<sup>-/-</sup>* accentua el fenotip bioquímic dels animals (elevació sistèmica de les concentracions de nucleòsids, desequilibri més acusat dels dNTPs), i també dona lloc a alteracions neuromusculars (descoordinació i desequilibri motor) i radiològiques (augment del volum dels ventricles del cervell) que mimetitzen alguns dels trets clínics observats en els pacients. Per tant, l'exposició oral crònica a aquests nucleòsids millora el model i el fan molt més útil per tal d'avaluar potencials teràpies.
2. La teràpia gènica basada en l'administració de vectors adenoassociats portadors del gen terapèutic *TYMP* dirigits al fetge en el model animal millorat, prevé tant l'acumulació de nucleòsids a nivell sistèmic com els trets fenotípics neuromusculars (descoordinació motora) i radiològics (increment del volum dels ventricles cerebrals).
3. Es confirma que, entre els promotors estudiats en aquest treball, el del gen AAT (alfa-1-antitripsina) és el que mostra una major eficàcia.
4. Dels 4 algorismes d'optimització de codons testats, l'única seqüència que incrementa l'expressió del vector és la que consisteix en utilitzar el codó més freqüent en *Homo sapiens* per cada posició. Aquesta seqüència dona lloc a més activitat timidina fosforilasa per cada còpia del vector comparat amb la seqüència codificant natural del gen *TYMP* en la línia cel·lular hepàtica humana *Huh7*.
5. Una optimització de seqüència addicional que consisteix a substituir els dinucleòtids CpG de la seqüència natural del gen, amb l'objectiu de fer-la menys immunògena, no afecta negativament la seva expressió d'una manera funcionalment rellevant, la qual cosa fa que aquesta versió lliure de dinucleòtids CpG pugui ser utilitzada en la versió clínica del vector.
6. Els resultats anteriors fan que, entre les diferents versions del vector estudiades, recomanem per al seu ús clínic la que consisteix en el promotor AAT seguit de la seqüència codificant natural del gen *TYMP* sense els dinucleòtids CpG.



## **8. BIBLIOGRAFIA**

---





1. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283:689–692.
2. Okamura K, Santa T, Nagae K, et al. Congenital oculoskeletal myopathy with abnormal muscle and liver mitochondria. *J Neurol Sci* 1976;27:79–91.
3. Rowland LP. Progressive external ophthalmoplegia. *Handbook of clinical neurology*. Elsevier. 1992.
4. Bardosi A, Creutzfeldt W, DiMauro S, et al. Myo-, neuro-, gastrointestinal encephalopathy (MNGIE syndrome) due to partial deficiency of cytochrome-c-oxidase. A new mitochondrial multisystem disorder. *Acta Neuropathol* 1987;74:248–58.
5. Simon LT, Horoupian DS, Dorfman LJ, et al. Polyneuropathy, ophthalmoplegia, leukoencephalopathy, and intestinal pseudo-obstruction: POLIP syndrome. *Ann Neurol* 1990;28:349–360.
6. Ionasescu V. Oculogastrointestinal muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1983;15:103–112.
7. Hirano M, Silvestri G, Blake DM, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994;44:721–721.
8. Hirano M, Garcia-de-Yebenes J, Jones AC, et al. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy Syndrome Maps to Chromosome 22q13.32-qter. *Am J Hum Genet* 1998;63:526–533.
9. Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: An autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann Neurol* 2000;47:792–800.
10. Hirano M, Nishigaki Y, Martí R. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE): A Disease of Two Genomes. *Neurologist* 2004;10:8–17.
11. Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain*

- 2011;134:3326–3332.
12. Pacitti D, Levene M, Garone C, et al. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy: Into the Fourth Decade, What We Have Learned So Far. *Front Genet* 2018;9:669.
  13. Filosto M, Cotti Piccinelli S, Caria F, et al. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE-MTDP51). *J Clin Med* 2018;7:389.
  14. Hirano M, Carelli V, De Giorgio R, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Position paper on diagnosis, prognosis, and treatment by the MNGIE International Network. *J Inherit Metab Dis* 2020;1–12.
  15. Marti R, Verschuuren JJGM, Buchman A, et al. Late-onset MNGIE due to partial loss of thymidine phosphorylase activity. *Ann Neurol* 2005;58:649–652.
  16. Massa R, Tessa A, Margollicci M, et al. Late-onset MNGIE without peripheral neuropathy due to incomplete loss of thymidine phosphorylase activity. *Neuromuscul Disord* 2009;19:837–840.
  17. Etienne G, Shamseddine K, Pulley M, et al. Two new gene mutations for late onset mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy (mngie). *Transl Neurosci* 2012;3:413–414.
  18. Needham M, Duley J, Hammond S, et al. Mitochondrial disease mimicking Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:99–100.
  19. Said G, Lacroix C, Planté-Bordeneuve V, et al. Clinicopathological aspects of the neuropathy of neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) in four patients including two with a Charcot-Marie-Tooth presentation. *J Neurol* 2005;252:655–662.
  20. Kučerová L, Dolina J, Dastyč M, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy imitating Crohn's disease: A rare cause of malnutrition. *J Gastrointest Liver Dis* 2018;27:321–325.
  21. Patel R, Coulter LL, Rimmer J, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal

- encephalopathy: A clinicopathological mimic of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2019;19:11.
22. Bedlack RS, Vu T, Hammans S, et al. MNGIE neuropathy: Five cases mimicking chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2004;29:364–368.
  23. Filosto M, Scarpelli M, Tonin P, et al. Pitfalls in diagnosing mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:1199–1203.
  24. Orphanet Report Series - Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data January 2020-Number 1 Available from: [http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_alphabetical\\_list.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf). Accessed March 26, 2020.
  25. Nishigaki Y, Martí R, Copeland WC, et al. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003;111:1913–1921.
  26. Giordano C, Sebastiani M, Plazzi G, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: Evidence of mitochondrial DNA depletion in the small intestine. *Gastroenterology* 2006;130:893–901.
  27. Giordano C, Sebastiani M, De Giorgio R, et al. Gastrointestinal Dysmotility in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy Is Caused by Mitochondrial DNA Depletion. *Am J Pathol* 2008;173:1120–1128.
  28. Vissing J, Ravn K, Danielsen ER, et al. Multiple mtDNA deletions with features of MNGIE. *Neurology* 2002;59:926–9.
  29. Papadimitriou A, Comi GP, Hadjigeorgiou GM, et al. Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology* 1998;51:1086–1092.
  30. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim* 2016;2:1–22.
  31. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*

- 2012;148:1145–1159.
32. Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1999;1410:103–123.
  33. D'Erchia AM, Atlante A, Gadaleta G, et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion* 2015;20:13–21.
  34. El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2017;1863:1539–1555.
  35. Cámara Y, González-Vioque E, Scarpelli M, et al. Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA. *Drug Discov Today* 2013;18:950–957.
  36. Norman RA, Barry ST, Bate M, et al. Crystal Structure of Human Thymidine Phosphorylase in Complex with a Small Molecule Inhibitor. *Structure* 2004;12:75–84.
  37. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: An immunohistochemical study. *J Pathol* 1995;176:183–190.
  38. Yoshimura A, Kuwazuru Y, Furukawa T, et al. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta* 1990;1034:107–13.
  39. Matsukawa K, Moriyama A, Kawai Y, et al. Tissue distribution of human gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its drug-induced expression. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:71–82.
  40. Lara MC, Valentino ML, Torres-Torronteras J, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Biochemical features and therapeutic approaches. *Biosci Rep* 2007;27:151–163.
  41. Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J* 1998;334:1–8.

42. Usuki K, Saras J, Waltenberger J, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1311–1316.
43. Gamez J, Ferreiro C, Accarino ML, et al. Phenotypic variability in a Spanish family with MNGIE. *Neurology* 2002;59:455–7.
44. Yasuda K, Murase N, Yoshinaga K, et al. Leukoencephalopathy with a case of heterozygous POLG mutation mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Clin Neurosci* 2019;61:302–304.
45. Prasun P, Koeberl DD. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype in a patient with a novel heterozygous POLG mutation. *J Neurol* 2014;261:1818–1819.
46. Shaibani A, Shchelochkov OA, Zhang S, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy due to mutations in RRM2B. *Arch Neurol* 2009;66:1028–1032.
47. Cox M, Nelson D. *Lehninger Principles of Biochemistry-Fifth Edition*. In: Wh Freeman. 2008.
48. Mathews CK. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J* 2006;20:1300–1314.
49. Håkansson P, Hofer A, Thelander L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* 2006;281:7834–7841.
50. Chabes A, Thelander L. Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem* 2000;275:17747–17753.
51. Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide Reductases. *Annu Rev Biochem* 2006;75:681–706.
52. Rampazzo C, Miazzi C, Franzolin E, et al. Regulation by degradation, a

- cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 2010;703:2–10.
53. Sandrini MPB, Piškur J. Deoxyribonucleoside kinases: Two enzyme families catalyze the same reaction. *Trends Biochem Sci* 2005;30:225–228.
54. Martí R, Spinazzola A, Tadesse S, et al. Definitive Diagnosis of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy by Biochemical Assays. *Clin Chem* 2004;50:120–124.
55. Valentino ML, Martí R, Tadesse S, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* 2007;581:3410–4.
56. Martí R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:14–18.
57. Spinazzola A, Marti R, Nishino I, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 2002;277:4128–4133.
58. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Emerging roles of nucleoside transporters. *Front Pharmacol* 2018;9:1–8.
59. Zaharko DS, Bolten BJ, Chiuten D, et al. Pharmacokinetic studies during phase i trials of high-dose thymidine infusions. *Cancer Res* 1979;39:4777–4781.
60. López LC, Akman HO, García-Cazorla Á, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18:714–722.
61. Ferraro P, Pontarin G, Crocco L, et al. Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Biol Chem* 2005;280:24472–80.
62. Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, et al. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281:22720–

- 22728.
63. González-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL, et al. Limited dCTP Availability Accounts for Mitochondrial DNA Depletion in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE). *PLOS Genet* 2011;7:e1002035.
  64. Nishigaki Y, Marti R, Hirano M. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 2004;13:91–101.
  65. Hirano M, Lagier-Tourenne C, Valentino ML, et al. Thymidine phosphorylase mutations cause instability of mitochondrial DNA. *Gene* 2005;354:152–156.
  66. D'Angelo R, Boschetti E, Amore G, et al. Liver transplantation in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical long-term follow-up and pathogenic implications. *J Neurol* 2020;1–9.
  67. La Marca G, Malvagia S, Casetta B, et al. Pre- and post-dialysis quantitative dosage of thymidine in urine and plasma of a MNGIE patient by using HPLC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 2006;41:586–592.
  68. Röeben B, Marquetand J, Bender B, et al. Hemodialysis in MNGIE transiently reduces serum and urine levels of thymidine and deoxyuridine, but not CSF levels and neurological function. *Orphanet J Rare Dis* 2017;12:135.
  69. Yavuz H, Özel A, Christensen M, et al. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch Neurol* 2007;64:435–438.
  70. Ariaudo C, Daidola G, Ferrero B, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy treated with peritoneal dialysis and bone marrow transplantation. *J Nephrol* 2014;28:125–127.
  71. Sivadasan A, Muthusamy K, Patil AK, et al. Pearls & Oysters: Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Neurology* 2016;86:e147–e150.
  72. Chandra VS, Lakshmi Sanggetha B, Padmavathi Devi SVV, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: A nonrenal



- indication for peritoneal dialysis. *Indian J Nephrol* 2018;28:310–313.
73. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, et al. Catabolism of thymidine in human blood platelets: purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 1981;654:211–8.
  74. Lara MC, Weiss B, Illa I, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1461–1463.
  75. Cesar JM, Vecino AM. Survival and function of transfused platelets. Studies in two patients with congenital deficiencies of platelet membrane glycoproteins. *Platelets* 2009;20:158–162.
  76. Hirano M, Martí R, Casali C, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1458–1460.
  77. Halter JP, Michael W, Schüpbach M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2015;138:2847–58.
  78. Yadak R, Boot M V, van Til NP, et al. Transplantation, gene therapy and intestinal pathology in MNGIE patients and mice. *BMC Gastroenterol* 2018;18:149.
  79. Halter J, Schüpbach W, Casali C, et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:330–337.
  80. Moran NF, Bain MD, Muqit MMK, et al. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for mngie. *Neurology* 2008;71:686–688.
  81. Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, et al. A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency. *Eur J Haematol* 2007;79:338–348.
  82. Levene M, Bain M, Moran N, et al. Safety and Efficacy of Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *J Clin Med* 2019;8:457.

83. Bax BE, Bain MD, Scarpelli M, et al. Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. *Neurology* 2013;81:1269–1271.
84. Chapman TP, Hadley G, Fratter C, et al. Unexplained gastrointestinal symptoms: Think mitochondrial disease. *Dig Liver Dis* 2014;46:1–8.
85. Bax BE, Levene M, Bain MD, et al. Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase for the Treatment of Patients with Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy: Study Protocol for a Multi-Centre, Multiple Dose, Open Label Trial. *J Clin Med* 2019;8:1096.
86. De Giorgio R, Pironi L, Rinaldi R, et al. Liver transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Ann Neurol* 2016;80:448–455.
87. Boschetti E, D'Alessandro R, Bianco F, et al. Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS One* 2014;9:10–15.
88. Kim WR, Lake JR, Smith JM, et al. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Liver. *Am J Transplant* 2018;18:172–253.
89. D'Angelo R, Rinaldi R, Pironi L, et al. Liver transplant reverses biochemical imbalance in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Mitochondrion* 2017;34:101–102.
90. Madhok J, Leong J, Cohn J. Anesthetic Considerations for Liver Transplantation in a Patient with Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Syndrome. *Cureus* 2019;11:e5038.
91. Kripps KA, Nakayuenyongsuk W, Shayota BJ, et al. Successful liver transplantation in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Mol Genet Metab* 2020;130:58–64.
92. Cámara Y, González-Vioque E, Scarpelli M, et al. Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet* 2013;23:2459–2467.

93. De Vocht C, Ranquin A, Willaert R, et al. Assessment of stability, toxicity and immunogenicity of new polymeric nanoreactors for use in enzyme replacement therapy of MNGIE. *J Control Release* 2009;137:246–254.
94. De Vocht C, Ranquin A, Van Ginderachter J, et al. Polymeric nanoreactors for enzyme replacement therapy of MNGIE. *J Control Release* 2010;148:e19–e20.
95. MNGIE / Entrada Therapeutics Available from: <https://www.entradatx.com/programs/mngie>. Accessed October 1, 2020.
96. Torres-Torronteras J, Gómez a, Eixarch H, et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* 2011;18:795–806.
97. Torres-torronteras J, Cabrera-pe R, Barba I, et al. Long-Term Restoration of Thymidine Phosphorylase Function and Nucleoside Homeostasis Using Hematopoietic Gene Therapy in a Murine Model of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2016;27:656–668.
98. Torres-Torronteras J, Viscomi C, Cabrera-Pérez R, et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther* 2014;22:901–7.
99. Torres-Torronteras J, Cabrera-Pérez R, Vila-Julià F, et al. Long-Term Sustained Effect of Liver-Targeted Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2018;29:708–718.
100. Cabrera-Pérez R, Vila-Julià F, Hirano M, et al. The Alpha-1-Antitrypsin Promoter Improves the Efficacy of an AAV Vector for the Treatment of MNGIE. *Hum Gene Ther* 2019;1–33.
101. Haraguchi M, Tsujimoto H, Fukushima M, et al. Targeted Deletion of Both Thymidine Phosphorylase and Uridine Phosphorylase and Consequent Disorders in Mice. *Mol Cell Biol* 2002;22:5212–5221.
102. el Kouni MH, el Kouni MM, Naguib FN. Differences in activities and substrate

- specificity of human and murine pyrimidine nucleoside phosphorylases: implications for chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res* 1993;53:3687–93.
103. Cao D, Leffert JJ, McCabe J, et al. Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. *J Biol Chem* 2005;280:21169–75.
  104. Garcia-Diaz B, Garone C, Barca E, et al. Deoxynucleoside stress exacerbates the phenotype of a mouse model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy. *Brain* 2014;137:1337–49.
  105. What is Gene Therapy? | FDA Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy#footnote1>. Accessed April 10, 2020.
  106. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Available from: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>. Accessed April 13, 2020.
  107. Ma CC, Wang ZL, Xu T, et al. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol Adv* 2020;40:107502.
  108. Shahryari A, Jazi MS, Mohammadi S, et al. Development and clinical translation of approved gene therapy products for genetic disorders. *Front Genet* 2019;10:868.
  109. Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, et al. Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Mol Ther* 2020;28:709–722.
  110. Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age. *Science* 2018;359:eaan4672.
  111. High KA, Roncarolo MG. Gene therapy. *N Engl J Med* 2019;381:455–464.
  112. Patil, Gao, Lin, et al. The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *Int J Mol Sci* 2019;20:5491.
  113. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet* 2014;15:541–555.
  114. Ramamoorth M, Narvekar A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An

- Overview. *J Clin DIAGNOSTIC Res* 2015;9:GE01.
115. Hardee C, Arévalo-Soliz L, Hornstein B, et al. Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes (Basel)* 2017;8:65.
116. Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Mol Ther* 2009;17:767–777.
117. Foldvari M, Chen DW, Nafissi N, et al. Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J Control Release* 2016;240:165–190.
118. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part I. Gene delivery technologies. *Discov Med* 2014;18:67–77.
119. Nyamay'Antu A, Dumont M, Kedingler V, et al. Non-Viral Vector Mediated Gene Delivery: the Outsider to Watch Out For in Gene Therapy. *Cell Gene Ther Insights* 2019;5:51–57.
120. Singh S, Kumar R, Agrawal B. Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects. In: *Adenoviruses*. IntechOpen. 2019.
121. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: Last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005;12:S18–S27.
122. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2018;8:87–104.
123. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, et al. Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol* 2013;36:1–22.
124. Goins WF, Huang S, Hall B, et al. Engineering HSV-1 Vectors for Gene Therapy. In: *Methods in Molecular Biology*; pp. 73–90.
125. Naldini L, Trono D, Verma IM. Lentiviral vectors, two decades later. *Science*;353.
126. Lundstrom K. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases* 2018;6:42.
127. Manservigi R. HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *Open Virol J*

- 2010;4:123–156.
128. Epstein A, Marconi P, Argnani R, et al. HSV-1-Derived Recombinant and Amplicon Vectors for Gene Transfer and Gene Therapy. *Curr Gene Ther* 2005;5:445–457.
  129. Marconi P, Argnani R, Berto E, et al. HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. *Hum Vaccin* 2008;4:91–105.
  130. Mastrangelo MJ, Lattime EC. Virotherapy clinical trials for regional disease: In situ immune modulation using recombinant poxvirus vectors. *Cancer Gene Ther* 2002;9:1013–1021.
  131. Ryu WS. Chapter 19. Virus vectors. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Elsevier Inc. 2016; pp. 263–275.
  132. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, et al. Development of a Self-Inactivating Lentivirus Vector. *J Virol* 1998;72:8150–8157.
  133. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 2012;443:603–618.
  134. Ryu WS. Chapter 10. Other DNA Viruses. In: *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Elsevier Inc. 2016; pp. 141–148.
  135. Muzyczka N. Chapter 6. Adeno-Associated Viral (AAV) Vectors. In: Herzog RW, Zolotukhin S (eds) *A Guide to Human Gene Therapy*. 2010; pp. 87–102.
  136. Berns KI, Muzyczka N. AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum Gene Ther* 2017;28:308–313.
  137. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2020;21:255–272.
  138. Weitzman MD, Linden RM. Adeno-Associated Virus Biology. *Methods Mol Biol* 2011;807:1–23.
  139. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol* 2012;507:229–254.

140. Sonntag F, Kother K, Schmidt K, et al. The Assembly-Activating Protein Promotes Capsid Assembly of Different Adeno-Associated Virus Serotypes. *J Virol* 2011;85:12686–12697.
141. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10220–10225.
142. Earley LF, Powers JM, Adachi K, et al. Adeno-associated Virus (AAV) Assembly-Activating Protein Is Not an Essential Requirement for Capsid Assembly of AAV Serotypes 4, 5, and 11. *J Virol* 2017;91:e01980-16.
143. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:358–378.
144. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 2016;530:108–112.
145. Pillay S, Zou W, Cheng F, et al. Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Have Distinctive Interactions with Domains of the Cellular AAV Receptor. *J Virol* 2017;91:e00391-17.
146. Dudek AM, Pillay S, Puschnik AS, et al. An Alternate Route for Adeno-associated Virus (AAV) Entry Independent of AAV Receptor. *J Virol* 2018;92:e02213-17.
147. Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 2012;19:649–658.
148. Finn JD, Hui D, Downey HD, et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on mhc class i following transduction. *Mol Ther* 2010;18:135–142.
149. Beard P. Section V: Small DNA Viruses of Eukaryotes- Chapter 20. Parvoviruses. In: *Fundamentals of Molecular Virology*. 2011; pp. 238–246.
150. Smith RH. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 2008;15:817–822.
151. Huang LY, Halder S, Agbandje-Mckenna M. Parvovirus glycan interactions.

- Curr Opin Virol 2014;7:108–118.
152. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* 2016;21:75–80.
  153. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 2008;16:1073–1080.
  154. Verdera HC, Kuranda K, Mingozzi F. AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. *Mol Ther* 2020;28:723–746.
  155. Donsante A, Miller DG, Li Y, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 2007;317:477.
  156. Chandler RJ, La Fave MC, Varshney GK, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 2015;125:870–880.
  157. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 2009;113:797–806.
  158. Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther* 2011;19:876–85.
  159. Valdmanis PN, Lisowski L, Kay MA. rAAV-Mediated tumorigenesis: Still unresolved after an AAV assault. *Mol Ther* 2012;20:2014–2017.
  160. Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011;117:3311–3319.
  161. Asokan A, Schaffer D V., Samulski RJ. The AAV vector toolkit: Poised at the clinical crossroads. *Mol Ther* 2012;20:699–708.
  162. Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, et al. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: Effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther* 2008;16:89–96.



163. Kattenhorn LM, Tipper CH, Stoica L, et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther* 2016;27:947–961.
164. Cao O, Dobrzynski E, Wang L, et al. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* 2007;110:1132–1140.
165. Flotte T, Carter B, Conrad C, et al. A phase I study of an adeno-associated Virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 1996;7:1145–1159.
166. Ylä-Herttuala S. Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* 2012;20:1831–1832.
167. Mechanism of Action | LUXTURNA® (voretigene neparvovec-rzyl) HCP Available from: <https://luxturnahcp.com/how-LUXTURNA-works/mechanism-of-action/>. Accessed October 22, 2020.
168. How It Works | ZOLGENSMA® (onasemnogene abeparvovec-xioi) Available from: <https://www.zolgensma.com/how-zolgensma-works>. Accessed October 22, 2020.
169. Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther* 2008;16:1189–1199.
170. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008;16:1648–1656.
171. Nathwani AC, Gray JT, Ng CYC, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 2006;107:2653–2661.
172. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994–2004.
173. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017;377:1713–1722.

174. Martino AT, Suzuki M, Markusic DM, et al. The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* 2011;117:6459–6468.
175. Lu J, Williams JA, Luke J, et al. A 5' noncoding exon containing engineered intron enhances transgene expression from recombinant AAV vectors in vivo. *Hum Gene Ther* 2017;28:125–134.
176. Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, et al. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: Implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999;10:2295–2305.
177. Scallan CD, Lillicrap D, Jiang H, et al. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood* 2003;102:2031–2037.
178. Yan Z, Sun X, Feng Z, et al. Optimization of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Expression for Large Transgenes, Using a Synthetic Promoter and Tandem Array Enhancers. *Hum Gene Ther* 2015;26:334–346.
179. Codon usage database Available from: <https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606&aa=1&style=N>. Accessed May 27, 2020.
180. Quax TEF, Claassens NJ, Söll D, et al. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Mol Cell* 2015;59:149–61.
181. Welch M, Villalobos A, Gustafsson C, et al. You're one in a googol: optimizing genes for protein expression. *J R Soc Interface* 2009;6:S467–S476.
182. Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:20–30.
183. Riba A, Nanni N Di, Mittal N, et al. Protein synthesis rates and ribosome occupancies reveal determinants of translation elongation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:15023–15032.
184. Tats A, Tenson T, Remm M. Preferred and avoided codon pairs in three domains of life. *BMC Genomics* 2008;9:463.

185. Buchan JR, Aucott LS, Stansfield I. tRNA properties help shape codon pair preferences in open reading frames. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1015–1027.
186. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 2015;160:1111–1124.
187. Bazzini AA, Del Viso F, Moreno-Mateos MA, et al. Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition. *EMBO J* 2016;35:2087–2103.
188. Verma IM. Gene Therapy. *Sci Am* 1990;262:68–84.
189. Morisaki T, Lyon K, DeLuca KF, et al. Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science* 2016;352:1425–1429.
190. Shah P, Ding Y, Niemczyk M, et al. Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell* 2013;153:1589.
191. Lewis CJ, Dixit B, Batiuk E, et al. Codon optimization is an essential parameter for the efficient allotopic expression of mtDNA genes. *Redox Biol* 2020;30:101429.
192. Pechmann S, Chartron JW, Frydman J. Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 2014;21:1100–1105.
193. Fath S, Bauer AP, Liss M, et al. Multiparameter RNA and codon optimization: A standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *PLoS One* 2011;6:e17596.
194. Sharp PM, Li W-H. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 1987;15:1281–1295.
195. Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, et al. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics* 2006;7:285.
196. Gaspar P, Oliveira JL, Frommlet J, et al. EuGene: Maximizing synthetic gene design for heterologous expression. *Bioinformatics* 2012;28:2683–2684.
197. Gould N, Hendy O, Papamichail D. Computational tools and algorithms for

- designing customized synthetic genes. *Front Bioeng Biotechnol* 2014;2:41.
198. Dong B, Nakai H, Xiao W. Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol Ther* 2010;18:87–92.
199. Ghosh A, Duan D. Expanding adeno-associated viral vector capacity: A tale of two vectors. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2007;24:165–178.
200. Lopes A, Vanvarenberg K, Pr at V, et al. Codon-Optimized P1A-Encoding DNA Vaccine: Toward a Therapeutic Vaccination against P815 Mastocytoma. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;8:404–415.
201. Shao W, Earley LF, Chai Z, et al. Double-stranded RNA innate immune response activation from long-term adeno-associated virus vector transduction. *JCI insight* 2018;3:e120474.
202. Kruzik A, Fetahagic D, Hartlieb B, et al. Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2019;14:126–133.
203. Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum Gene Ther* 2010;21:704–712.
204. Calcedo R, Wilson JM. Humoral Immune Response to AAV. *Front Immunol* 2013;4:e341.
205. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, et al. Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24:59–67.
206. Martino AT, Basner-Tschakarjan E, Markusic DM, et al. Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells. *Blood* 2013;121:2224–2233.
207. Shao W, Chen X, Samulski RJ, et al. Inhibition of antigen presentation during AAV gene therapy using virus peptides. *Hum Mol Genet* 2017;27:601–613.
208. Yadak R, Cabrera-P erez R, Torres-Torronteras J, et al. Preclinical Efficacy

- and Safety Evaluation of Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in a Mouse Model of MNGIE. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2018;8:152–165.
209. Mingozi F, A. High K. Immune Responses to AAV in Clinical Trials. *Curr Gene Ther* 2011;11:321–330.
210. Sambrook J et al. Appendixes:Phenol-Chloroform extractions. In: *Molecular cloning (A laboratory manual)* ·th book. 2nd ed. 1989; pp. E3–E4.
211. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
212. Perez-Perez M-J, Priego E-M, Hernandez A-I, et al. Thymidine Phosphorylase Inhibitors: Recent Developments and Potential Therapeutic Applications. *Mini-Reviews Med Chem* 2005;5:1113–1123.
213. Martí R, López LC, Hirano M. Assessment of thymidine phosphorylase function: measurement of plasma thymidine (and deoxyuridine) and thymidine phosphorylase activity. *Methods Mol Biol* 2012;837:121–33.
214. Moolenbeek C, Ruitenberg EJ. The “Swiss roll”: A simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* 1981;15:57–59.
215. Rotarod performance test Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Rotarod\\_performance\\_test](https://en.wikipedia.org/wiki/Rotarod_performance_test). Accessed May 7, 2020.
216. Hug N, Longman D, Cáceres JF. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res* 2015;44:1483–1495.
217. Courel M, Clément Y, Bossevain C, et al. Gc content shapes mRNA storage and decay in human cells. *Elife* 2019;8:e49708.
218. Hia F, Yang SF, Shichino Y, et al. Codon bias confers stability to human mRNAs. *EMBO Rep* 2019;20:e48220.
219. Faust SM, Bell P, Cutler BJ, et al. CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J Clin Invest* 2013;123:2994–3001.
220. Tsuneyoshi K, Haraguchi M, Hongye Z, et al. Induction of thymidine

- phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity. *Cancer Lett* 2006;244:239–246.
221. Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999;96:307–310.
222. Li W, Yue H. Thymidine phosphorylase: A potential new target for treating cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2018;28:157–171.
223. Meinders M, Shoemark D, Dobbe JGG, et al. Expression and Retention of Thymidine Phosphorylase in Cultured Reticulocytes as a Novel Treatment for MNGIE. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2020;17:822–830.
224. Mandell JG, Neuberger T, Drapaca CS, et al. The dynamics of brain and cerebrospinal fluid growth in normal versus hydrocephalic mice: Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr* 2010;6:1–10.
225. JONES BJ, ROBERTS DJ. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 1968;20:302–304.
226. Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an Intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther* 2000;1:522–532.
227. Colella P, Sellier P, Costa Verdera H, et al. AAV Gene Transfer with Tandem Promoter Design Prevents Anti-transgene Immunity and Provides Persistent Efficacy in Neonate Pompe Mice. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2019;12:85–101.
228. Nathwani AC. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 2006;107:2653–2661.
229. McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* 2013;121:3335–3344.

230. Davidoff AM, Gray JT, Ng CYC, et al. Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther* 2005;11:875–888.
231. McBurney MW, Mai T, Yang X, et al. Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured mammalian cells: Inactivation of tandem repeats of transfected genes. *Exp Cell Res* 2002;274:1–8.
232. Mitsuda S, Shimizu N. Epigenetic Repeat-Induced Gene Silencing in the Chromosomal and Extrachromosomal Contexts in Human Cells. *PLoS One* 2016;11:e0161288.
233. Lisowski L, Dane AP, Chu K, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* 2014;506:382–386.
234. Vercauteren K, Hoffman BE, Zolotukhin I, et al. Superior in vivo Transduction of Human Hepatocytes Using Engineered AAV3 Capsid. *Mol Ther* 2016;24:1042–1049.
235. Boisgerault F, Mingozzi F. The Skeletal Muscle Environment and Its Role in Immunity and Tolerance to AAV Vector-Mediated Gene Transfer. *Curr Gene Ther* 2015;15:381–394.
236. Wang Z, Allen JM, Riddell SR, et al. Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2007;18:18–26.
237. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, et al. Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther* 2007;14:1249–1260.
238. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: Overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122:23–36.
239. Poupiot J, Costa Verdera H, Hardet R, et al. Role of Regulatory T Cell and Effector T Cell Exhaustion in Liver-Mediated Transgene Tolerance in Muscle. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2019;15:83–100.

240. Keeler GD, Markusic DM, Hoffman BE. Liver induced transgene tolerance with AAV vectors. *Cell Immunol* 2019;342:103728.
241. Yan Z, Yan H, Ou H. Human thyroxine binding globulin (TBG) promoter directs efficient and sustaining transgene expression in liver-specific pattern. *Gene* 2012;506:289–294.
242. Shen RF, Clift SM, Demayo JL, et al. Tissue-Specific Regulation of Human  $\alpha$ 1-Antitrypsin Gene Expression in Transgenic Mice. *DNA* 1989;8:101–108.
243. Masyuk AI, Masyuk T V, LaRusso NF. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *J Hepatol* 2013;59:621–625.
244. Sung S, Kim J, Jung Y. Liver-derived exosomes and their implications in liver pathobiology. *Int J Mol Sci* 2018;19:3715.
245. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. Exocarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 2012;1:18374.
246. Song S, Wheeler LJ, Mathews CK. Deoxyribonucleotide Pool Imbalance Stimulates Deletions in HeLa Cell Mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2003;278:43893–43896.
247. Martino AT, Markusic DM. Immune Response Mechanisms against AAV Vectors in Animal Models. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2020;17:198–208.
248. Zhang R, Wang Q, Zhang L, et al. Optimized human factor IX expression cassettes for hepatic-directed gene therapy of hemophilia B. *Front Med* 2015;9:90–99.
249. Ward NJ, Buckley SMK, Waddington SN, et al. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood* 2011;117:798–807.
250. Fischer MD, McClements ME, Martinez-Fernandez De La Camara C, et al. Codon-Optimized RPGR Improves Stability and Efficacy of AAV8 Gene Therapy in Two Mouse Models of X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther* 2017;25:1854–1865.
251. Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, et al. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-



- associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology* 2013;10:74.
252. Plotkin JB, Robins H, Levine AJ. Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. *PNAS* 2004;101:12588–12591.
253. Dittmar KA, Goodenbour JM, Pan T. Tissue-Specific Differences in Human Transfer RNA Expression. *PLoS Genet* 2006;2 (12):e221.
254. Berasain C, Avila MA. Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:3831–3851.
255. Zhou Z, Dang Y, Zhou M, et al. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *PNAS* 2016;113:e6177–e6125.
256. Xiang ZQ, Kurupati RK, Li Y, et al. The Effect of CpG Sequences on Capsid-Specific CD8+ T Cell Responses to AAV Vector Gene Transfer. *Mol Ther* 2020;28:771–783.
257. Ashley SN, Somanathan S, Giles AR, et al. TLR9 signaling mediates adaptive immunity following systemic AAV gene therapy. *Cell Immunol* 2019;346:103997.
258. Konkle BA, Walsh C, Escobar MA, et al. BAX 335 hemophilia B gene therapy clinical trial results - potential impact of CpG sequences on gene expression. *Blood*. Epub ahead of print October 16, 2020. DOI: 10.1182/blood.2019004625.
259. Wright JF. Codon Modification and PAMPs in Clinical AAV Vectors: The Tortoise or the Hare? *Mol Ther* 2020;28:701–703.
260. Pasi KJ, Rangarajan S, Mitchell N, et al. Multiyear Follow-up of AAV5-hFVIII-SQ Gene Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med* 2020;382:29–40.
261. La Bella T, Imbeaud S, Peneau C, et al. Adeno-associated virus in the liver: Natural history and consequences in tumour development. *Gut* 2020;69:737–747.
262. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, et al. Recurrent AAV2-related insertional

- mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015;47:1187–1193.
263. Mingozi F, Schüttrumpf J, Arruda VR, et al. Improved Hepatic Gene Transfer by Using an Adeno-Associated Virus Serotype 5 Vector. *J Virol* 2002;76:10497–10502.
264. Miesbach WA, Meyer C, Nijmeijer B, et al. Phase 1-2 Clinical Trial of a Recombinant AAV5 Vector Containing the Human FIX Gene in Patients with Severe or Moderately Severe Haemophilia B. *Blood* 2014;124:5948–5948.
265. D'Avola D, López-Franco E, Sangro B, et al. Phase I open label liver-directed gene therapy clinical trial for acute intermittent porphyria. *J Hepatol* 2016;65:776–783.
266. Qian R, Xiao B, Li J, et al. Directed Evolution of AAV Serotype 5 for Increased Hepatocyte Transduction and Retained Low Humoral Seroreactivity. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. Epub ahead of print October 20, 2020. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.10.010.
267. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011;365:2357–65.
268. Pañeda A, Vanrell L, Mauleon I, et al. Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther* 2009;20:908–917.
269. Davidoff AM, Ng CYC, Zhou J, et al. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 2003;102:480–488.
270. Pañeda A, Lopez-Franco E, Kaepfel C, et al. Safety and Liver Transduction Efficacy of rAAV5- *cohPBGD* in Nonhuman Primates: A Potential Therapy for Acute Intermittent Porphyria. *Hum Gene Ther* 2013;24:1007–1017.

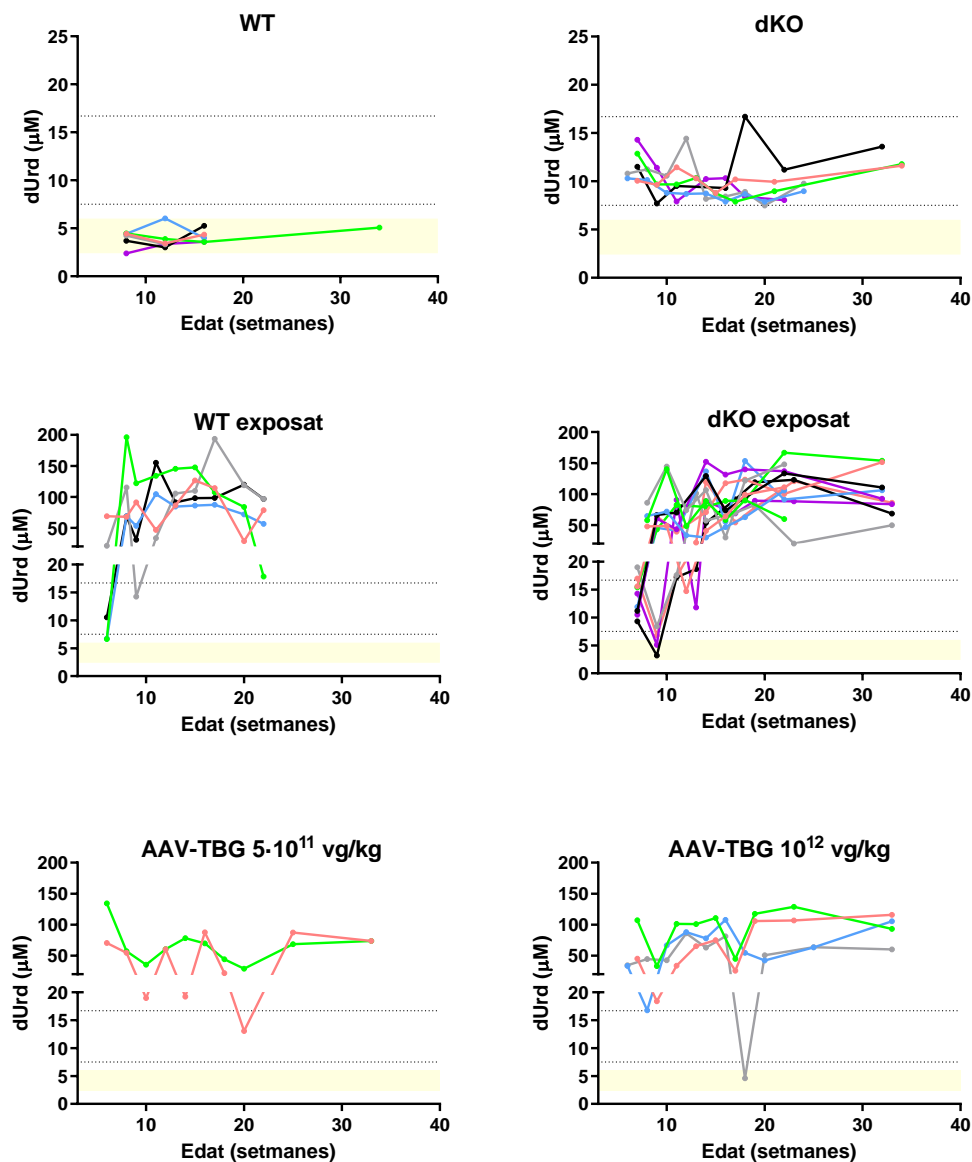


## **9. ANNEX I**

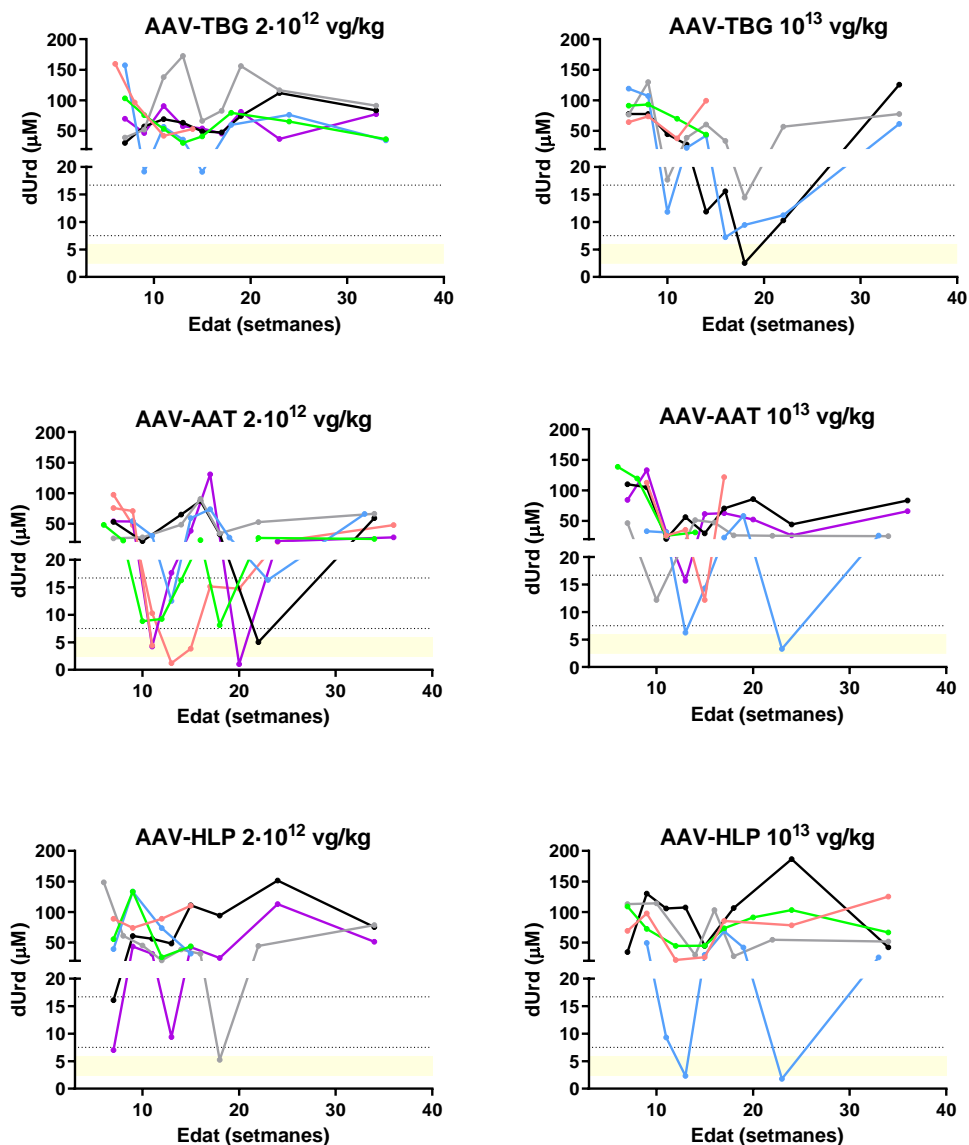
---



## 9.1. SEGUIMENT DE LA CONCENTRACIÓ DE dUrd EN PLASMA



**Figura 9.1. Seguiment de la concentració de dUrd plasmàtica.** Concentració de dUrd en plasma entre 4 i 35 setmanes d'edat en ratolins WT ( $n=6$ ), dKO ( $n=6$ ), WT exposat ( $n=5$ ) i ratolins dKO exposats ( $n=13$ ) i tractats amb AAV-TBG a dosis de TBG  $5 \cdot 10^{11}$  vg/kg ( $n=2$ ) i de TBG  $10^{12}$  vg/kg ( $n=4$ ). Cada línia representa un ratolí i cada punt una mesura. L'àrea ombrada representa el rang de concentració plasmàtica de ratolins WT, i la zona entre les línies horitzontals de punts negres, el rang de concentració plasmàtica de ratolins dKO



**Figura 9.2. Seguiment de la concentració de dUrd plasmàtica.** Concentració de dUrd plasmàtica entre 4 i 35 setmanes d'edat en ratolins dKO exposats tractats amb 3 rAAVs a diferents dosis: (AAV-TBG:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=5$ ); AAV-AAT:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=7$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=6$ ); AAV-HLP:  $2 \cdot 10^{12}$  vg/kg ( $n=6$ ) i  $10^{13}$  vg/kg ( $n=5$ )). L'àrea ombrejada representa el rang de concentració plasmàtica de ratolins WT, i la zona entre les línies horitzontals de punts negres, el rang de concentració plasmàtica de ratolins dKO.

## 9.2. SEQÜÈNCIES CODIFICANTS DEL GEN *TYMP* MODIFICADES

### Seqüència codificant del gen *TYMP*

>BC052211.2 Homo sapiens thymidine phosphorylase, mRNA (cDNA clone MGC:34335 IMAGE:5174407), complete cds

ATGGCAGCCTTGATGACCCCGGGAACCGGGGCCCCACCCGCGCCTGGTGACTTCTCCGGGG  
AAGGGAGCCAGGGACTTCCCGACCCTTCGCCAGAGCCCAAGCAGCTCCCGGAGCTGATCCG  
CATGAAGCGAGACGGAGGCCGCCTGAGCGAAGCGGACATCAGGGGCTTCGTGGCCGCTGTG  
GTGAATGGGAGCGCGCAGGGCGCACAGATCGGGGCCATGCTGATGGCCATCCGACTTCGGG  
GCATGGATCTGGAGGAGACCTCGGTGCTGACCCAGGCCCTGGCTCAGTCGGGACAGCAGCT  
GGAGTGGCCAGAGGCCCTGGCGCCAGCAGCTTGTGGACAAGCATTCCACAGGGGGTGTGGGT  
GACAAGGTCAGCCTGGTCCTCGCACCTGCCCTGGCGGCATGTGGCTGCAAGGTGCCAATGA  
TCAGCGGACGTGGTCTGGGGCACACAGGAGGCACCTTGGATAAGCTGGAGTCTATTCCCTGG  
ATTC AATGTCATCCAGAGCCCAGAGCAGATGCAAGTGCTGCTGGACCAGGCGGGCTGCTGT  
ATCGTGGGT CAGAGTGAGCAGCTGGTTCCCTGCGGACGGAATCCTATATGCAGCCAGAGATG  
TGACAGCCACCGTGGACAGCCTGCCACTCATCACAGCCTCCATTCTCAGTAAGAACTCGT  
GGAGGGGCTGTCCGCTCTGGTGGTGGACGTTAAGTTCGGAGGGGGCCCGCTTCCCCAAC  
CAGGAGCAGGCCCGGGAGCTGGCAAAGACGCTGGTTGGCGTGGGAGCCAGCCTAGGGCTTC  
GGGTCGCGGCAGCGCTGACCGCCATGGACAAGCCCCTGGGTCGCTGCGTGGGCCACGCCCT  
GGAGGTGGAGGAGGCGCTGCTCTGCATGGACGGCGCAGGCCCGCCAGACTTAAGGGACCTG  
GTCACCACGCTCGGGGGCGCCCTGCTCTGGCTCAGCGGACACGCGGGGACTCAGGCCCAGG  
GCGCTGCCCGGGTGGCCGCGGCGCTGGACGACGGCTCGGCCCTTGGCCGCTTCGAGCGGAT  
GCTGGCGGCGCAGGGCGTGGATCCCGGTCTGGCCCGAGCCCTGTGCTCGGGAAGTCCCGCA  
GAACGCCGGCAGCTGCTGCCTCGCGCCCCGGGAGCAGGAGGAGCTGCTGGCGCCCGCAGATG  
GCACCGTGGAGCTGGTCCGGGCGCTGCCGCTGGCGCTGGTGTGCACGAGCTCGGGGGCCGG  
GCGCAGCCGCGCTGGGGAGCCGCTCCGCCTGGGGTGGGCGCAGAGCTGCTGGTTCGACGTG  
GGTCAGAGGCTGCGCCGTGGGACCCCCTGGCTCCGCGTGCACCGGGACGGCCCCGCGCTCA  
GCGGCCCCGAGAGCCGCGCCCTGCAGGAGGCGCTCGTACTCTCCGACCGCGGCCATTTCGC  
CGCCCCCTTGCCCTTCGCAGAGCTCGTTCTGCCGCCGAGCAATAA



**Seqüència optimitzada A**

ATGGCCGCCCTGATGACCCCCGGCACCGGCGCCCCCCCCGCCCCGGCGACTTCAGCGGCG  
AGGGCAGCCAGGGCCTGCCCCACCCCAGCCCCGAGCCCAAGCAGCTGCCCGAGCTGATCAG  
AATGAAGAGAGACGGCGGCAGACTGAGCGAGGCCGACATCAGAGGCTTCGTGGCCGCCGTG  
GTGAACGGCAGCGCCCAGGGCGCCCAGATCGGCGCCATGCTGATGGCCATCAGACTGAGAG  
GCATGGACCTGGAGGAGACCAGCGTGCTGACCCAGGCCCTGGCCCAGAGCGGCCAGCAGCT  
GGAGTGGCCCCGAGGCCTGGAGACAGCAGCTGGTGGACAAGCACAGCACCGGGCGGCGTGGGC  
GACAAGGTGAGCCTGGTGTGGCCCCGCCCTGGCCGCCTGCGGCTGCAAGGTGCCCATGA  
TCAGCGGCAGAGGCCTGGGCCACACCGGCGGCACCCTGGACAAGCTGGAGAGCATCCCCGG  
CTTCAACGTGATCCAGAGCCCCGAGCAGATGCAGGTGCTGCTGGACCAGGCCGGCTGCTGC  
ATCGTGGGCCAGAGCGAGCAGCTGGTGGCCGCGACGGCATCCTGTACGCCGCCAGAGACG  
TGACCGCCACCGTGGACAGCCTGCCCCTGATCACCGCCAGCATCCTGAGCAAGAAGCTGGT  
GGAGGGCCTGAGCGCCCTGGTGGTGGACGTGAAGTTCGGCGGGCGCCGCCGTGTTCCCTAAT  
CAGGAACAAGCTCGGGAGCTGGCCAAGACCCTGGTGGGCGTGGGCGCCAGCCTGGGCCTGA  
GAGTGGCCGCCGCCCTGACCGCCATGGACAAGCCCCTGGGCAGATGCGTGGGCCACGCCCT  
GGAGGTGGAGGAGGCCCTGCTGTGCATGGACGGCGCCGGCCCCCCCCGACCTGAGAGACCTG  
GTGACCACCCTGGGCGGCGCCCTGCTGTGGCTGAGCGGCCACGCCGGCACCCAGGCCCAGG  
GCGCCGCCAGAGTGGCCGCCGCCCTGGACGACGGCAGCGCCCTGGGCAGATTCGAGAGAAT  
GCTGGCCGCCAGGGCGTGGACCCCGGCCTGGCCAGAGCCCTGTGCAGCGGCAGCCCCGCC  
GAGAGAAGACAGCTGCTGCCAGAGCCAGAGAGCAGGAGGAGCTGCTGGCCCCCGCCGACG  
GCACCGTGGAGCTGGTGAAGGCCCTGCCCTGGCCCTGGTGTGCACGAGCTGGGCGCCGG  
CAGAAGCAGAGCCGGCAGCCCCCTGAGACTGGGCGTGGGCGCCGAGCTGCTGGTGGACGTG  
GGCCAGAGACTGAGAAGAGGCACCCCCTGGCTGAGAGTGCACAGAGACGGCCCCGCCCTGA  
GCGGCCCCCAGAGCAGAGCCCTGCAGGAGGCCCTGGTGTGAGCGACAGAGCCCCCTTCGC  
CGCCCCCTGCCCTTCGCCGAGCTGGTGTGCCCCCCCAGCAGTGA

**Seqüència optimitzada B**

ATGGCTGCCCTCATGACCCCAGGCACTGGAGCCCCGCCGGCCCCCTGGGGACTTCTCTGGAG  
 AGGGCAGCCAGGGCCTGCCTGACCCCAGCCCTGAGCCCAAGCAGCTGCCTGAGCTGATCCG  
 CATGAAGAGGGGATGGGGGCCGCCTGAGTGAGGCTGACATCCGTGGCTTTGTGGCGGGCGGTG  
 GTGAATGGCTCTGCCAGGGGGCCAGATTGGAGCCATGCTGATGGCCATCCGCCTGCGGG  
 GCATGGACCTGGAGGAGACCTCTGTGCTGACCCAGGCCCTGGCCAGTCTGGCCAGCAGCT  
 GGAGTGGCCTGAGGCCTGGAGACAGCAGCTGGTGGACAAGCACAGCACTGGTGGTGTGGGG  
 GACAAGGTGAGCCTGGTGCTGGCCCCCTGCCCTGGCGGCCTGTGGCTGCAAAGTGCCCATGA  
 TTTCTGGCCGGGGCCTGGGCCACACAGGGGGCACCCCTGGACAAGCTGGAGAGCATCCCTGG  
 CTTCAATGTCATCCAGAGCCCAGAGCAGATGCAGGTGCTGCTGGACCAGGCTGGCTGCTGC  
 ATCGTGGGCCAGAGTGAGCAGCTGGTGCCTGCAGATGGCATCCTGTATGCTGCCCGGGATG  
 TGACAGCCACTGTGGACAGCCTGCCCTGATCACAGCCTCCATCCTGAGCAAGAAGCTGGT  
 GGAGGGCCTGTCTGCCCTGGTGGTGGATGTGAAGTTTGGTGGCGCGGGCGGTGTTCCCCAAC  
 CAGGAGCAGGCCCGGGAGCTGGCCAAGACCCTGGTGGGCGTGGGGGCCAGCCTGGGCCTGC  
 GGGTGGCTGCAGCCCTGACAGCCATGGACAAGCCCCCTGGGCCGCTGTGTGGGCCATGCCCT  
 GGAGGTGGAGGAGGCCCTGCTGTGCATGGATGGTGTGGGCCCGGGACCTGCGGGACCTG  
 GTGACCACCCTGGGCGGGCCCTGCTGTGGCTGTGGGCCACGCGGGCACCCAGGCCCAGG  
 GGGCCGCCCGGGTGGCGGGCGGCCCTGGATGATGGGTCTGCCCTGGGCCGCTTTGAGAGGAT  
 GCTGGCTGCCAGGGCGTGGACCCTGGCCTGGCCCCGGGCCCTGTGCAGCGGCAGCCCTGCT  
 GAGCGGCGGCAGCTGCTGCCCCGGGCCCGGGAGCAGGAGGAGCTGCTGGCCCCAGCTGATG  
 GCACTGTGGAGCTGGTGCGGGCCCTGCCCTGGCCCTGGTGTGCATGAGCTGGGTGCTGG  
 CCGCAGCAGAGCTGGAGAGCCCCTGCGGCTGGGGGTGGGGGCTGAGCTGCTGGTGGATGTG  
 GGCCAGCGGCTGCGCCGGGGCACCCCCTGGCTGCGGGTGCACAGAGATGGCCCTGCCCTGA  
 GTGGCCCCCAGAGCCGGGCCCTGCAGGAGGCCCTGGTGTCTCAGTGACAGAGCCCCCTTGG  
 TGCCCCCCTGCCCTTTGCTGAGCTGGTGTGCTGCCCCCTCAGCAGTGA

**Seqüència optimitzada C**

ATGGCTGCCCTCATGACCCCAGGCACAGGGGCCCCCCCAGCCCCTGGGGACTTCAGCGGAG  
AGGGCAGCCAGGGACTGCCAGACCCCAGCCCCAGCCCAAGCAGCTCCCTGAGCTCATCCG  
CATGAAGCGGGACGGGGGCAGGCTGAGCGAGGCTGACATCAGAGGCTTTGTGGCCGCCGTG  
GTCAATGGAAGCGCCCAGGGTGCCAGATCGGCGCCATGCTGATGGCCATCCGGCTCCGGG  
GCATGGACCTGGAAGAGACCAGCGTCCTGACCCAGGCACTGGCACAGAGTGGGCAGCAACT  
GGAGTGGCCAGAGGCCTGGCGGCAGCAGCTGGTGGACAAGCACAGCACCGGGCGGCTGGGC  
GACAAAGTGTCCCTGGTGCTGGCTCCTGCCCTGGCGGCCTGTGGGTGCAAGGTCCCCATGA  
TCAGTGGCCGCGGCCTCGGCCACACTGGAGGCACGCTGGATAAGTTGGAGTCCATCCCCGG  
CTTCAACGTCATCCAGTCCCCAGAACAGATGCAGGTGCTTCTGGACCAGGCCGGCTGCTGC  
ATCGTGGGACAGTCTGAGCAGTTGGTGCCCGCAGATGGCATCCTGTATGCTGCCAGAGACG  
TGACCGCCACAGTGGACAGCCTGCCGCTGATCACAGCCAGCATCCTCTCCAAGAAGCTGGT  
GGAGGGGCTGTCCGCGCTGGTGGTGGATGTGAAGTTTGGAGGAGCAGCTGTGTTCCCCAAC  
CAGGAGCAAGCCCCGGGAGCTGGCCAAGACCCTCGTGGGGGTGGGGCCCTCCCTGGGCCTGA  
GAGTGGCTGCTGCACTGACAGCAATGGACAAGCCCCTGGGGCGCTGTGTGGGCCATGCCCT  
GGAGGTGGAGGAGGCATTGCTCTGCATGGATGGGGCTGGGCCACCTGACCTCAGAGATCTG  
GTCACCACCCTGGGCGGCGCTCTCCTGTGGCTCAGCGGACATGCTGGCACTCAGGCTCAGG  
GCGCGGCCCGCGTGGCAGCAGCCTTGATGATGGAAGTGCCTTGGGAAGATTTGAGAGGAT  
GCTCGCCGCGCAGGGGGTGGACCCTGGCTTGGCCGAGCCCTGTGCAGCGGCTCCCCTGCT  
GAGCGGCGCCAGCTGCTCCCCAGGGCCAGGGAGCAGGAGGAAGTGTGGCCCCAGCAGACG  
GCACCGTGGAACCTGTGAGAGCCCTGCCCTTGGCTCTGGTTCTGCACGAGTTGGGGGCAGG  
CCGGAGCCGGGCCGGGAGCCTCTGCGCCTGGGAGTTGGAGCCGAGCTGCTGGTAGATGTT  
GGCCAGCGGCTGAGGAGAGGGACCCCCTGGCTGCGGGTGCACAGGGATGGCCCCGCCCTGT  
CTGGGCCCCAGAGCCGCGCCCTGCAGGAAGCCCTCGTGCTCAGTGACCGGGCACCCCTTCG  
CGCTCCACTGCCCTTTGCAGAGCTTGTGCTGCCTCCTCAGCAGTGA

**Seqüència optimitzada D**

ATGGCTGCTCTGATGACACCTGGAACAGGCGCCCTCCTGCCCTGGCGATTTTTCTGGCG  
AGGGCTCTCAGGGCCTGCCCGATCCATCTCCTGAGCCCAAGCAGCTGCCCGAGCTGATCAG  
AATGAAGCGGGACGGCGGCAGACTGAGCGAGGCCGATATCAGAGGATTCGTGGCCGCCGTG  
GTCAATGGATCTGCCAGGGCGCCAGATCGGAGCCATGCTGATGGCCATTCGGCTGCGGG  
GCATGGACCTGGAAGAGACATCTGTGCTGACCCAGGCCCTGGCCAGTCTGGACAGCAGCT  
GGAATGGCCCAGGCTTGAGGCAGCAGCTCGTGGATAAGCACTCTACAGGCGGCCTGGGC  
GACAAGGTGTCACTGGTGCTGGCTCCAGCCCTGGCTGCCTGCGGCTGCAAGGTGCCAATGA  
TCTCTGGCAGAGGCCTGGGCCACACCGGCGGCACACTGGATAAGCTGGAATCCATCCCCGG  
CTTCAACGTGATCCAGAGCCCCGAGCAGATGCAGGTCTGCTGGATCAGGCCGGCTGCTGT  
ATCGTGGGCCAGTCTGAGCAGCTGGTGCCCGCGATGGAATCCTGTACGCCGCCAGAGATG  
TGACCGCCACCGTGGACAGCCTGCCTCTGATCACAGCCAGCATCCTGAGCAAGAACTGGT  
GGAAGGCCTGAGCGCCCTGGTGGTGGATGTGAAATTTGGCGGAGCCCGGTGTTCCCAAAT  
CAAGAACAGGCCAGAGAGCTGGCCAAGACCCTCGTGGGAGTGGGAGCCTCTCTGGGACTGA  
GAGTGGCTGCCGCCCTGACCGCCATGGATAAGCCCTGGGAAGATGTGTGGGCCACGCCCT  
GGAAGTGAAGAGGCCCTGCTGTGTATGGATGGCGCCGGACCTCCCGACCTGAGAGATCTG  
GTCACAACACTGGGAGGCGCTCTGCTGTGGCTGTCTGGACATGCCGGAACACAGGCTCAGG  
GCGCAGCTAGAGTGGCCGCTGCACTGGATGATGGCTCTGCCCTGGGGAGATTCGAGAGAAT  
GCTGGCCGCACAGGGCGTCGACCCTGGACTGGCTAGAGCCCTGTGTTCTGGCTCCCCTGCC  
GAGAGAAGGCAGCTCCTGCCTAGAGCCCGGGAACAGGAAGAACTGCTGGCCCCAGCTGACG  
GCACAGTGGAACTCGTCAGAGCCCTGCCACTGGCCCTGGTGTGCTGCATGAACTGGGAGCCGG  
AAGAAGCAGAGCCGGCGAGCCTCTGAGACTGGGCGTGGGAGCTGAACTGCTCGTGGACGTG  
GGACAGCGGCTGAGAAGAGGCACCCCTTGCTGAGAGTGCACAGAGATGGACCTGCCCTGA  
GCGGCCACAGTCTAGGGCTCTGCAGGAAGCCCTGGTCCTGAGCGACAGAGCCCTTTTGC  
CGCCCTCTGCCATTTGCCGAACTGGTCCTGCCTCCCCAGCAGTGA

**Seqüència *TYMP* wild-type sense CG**

ATGGCAGCCTTGATGACCCCTGGAACAGGGGGCCCCACCTGCCCTGGTGACTTCTCTGGGG  
AAGGGAGCCAGGGACTTCCTGACCCTAGCCCAGAGCCCAAGCAGCTCCCTGAGCTGATCAG  
AATGAAGAGAGATGGAGGCAGACTGTCTGAAGCTGACATCAGGGGCTTTGTGGCTGCTGTG  
GTGAATGGGTCTGCCAGGGGGCACAGATTGGGGCCATGCTGATGGCCATCAGACTTAGAG  
GCATGGATCTGGAGGAGACCTCTGTGCTGACCCAGGCCCTGGCTCAGTCTGGACAGCAGCT  
GGAGTGGCCAGAGGCCTGGAGACAGCAGCTTGTGGACAAGCATTCCACAGGGGGTGTGGGT  
GACAAGGTCAGCCTGGTCCTGGCACCTGCCCTGGCTGCATGTGGCTGCAAGGTGCCAATGA  
TCTCTGGAAGAGGTCTGGGGCACACAGGAGGCACCTTGGATAAGCTGGAGTCTATTCTGG  
ATTCAATGTCATCCAGAGCCCAGAGCAGATGCAAGTGCTGCTGGACCAGGCTGGCTGCTGT  
ATTGTGGGTGAGAGTGGAGCAGCTGGTTCTGCTGATGGAATCCTATATGCAGCCAGAGATG  
TGACAGCCACAGTGGACAGCCTGCCACTCATCACAGCCTCCATTCTCAGTAAGAAACTGGT  
GGAGGGGCTGTCTGCTCTGGTGGTGGATGTTAAGTTTGGAGGGGGCTGCTGTCTTCCCCAAC  
CAGGAGCAGGCCAGAGAGCTGGCAAAGACACTGGTTGGGGTGGGAGCCAGCCTAGGGCTTA  
GAGTGGCTGCAGCCCTGACAGCCATGGACAAGCCCCTGGGTAGATGTGTGGGCCATGCCCT  
GGAGGTGGAGGAGGCCCTGCTCTGCATGGATGGGGCAGGCCCCCAGACTTAAGGGACCTG  
GTCACCACACTGGGGGGGGCCCTGCTCTGGCTCTCTGGACATGCTGGGACTCAGGCCCAGG  
GGGCTGCCAGAGTGGCTGCTGCTCTGGATGATGGCTCTGCCCTTGGCAGATTTGAGAGAAT  
GCTGGCTGCTCAGGGGGTG<sub>gac</sub>CCTGGTCTGGCCAGAGCCCTGTGCTCTGGAAGTCCTGCA  
GAAAGAAGACAGCTGCTGCCTAGAGCCAGAGAGCAGGAGGAGCTGCTGGCTCCTGCAGATG  
GCACAGTGGAGCTGGTCAGAGCTCTGCCCTGGCCCTGGTGTGCATGAGCTGGGGGCTGG  
GAGAAGCAGAGCTGGGGAGCCCCCTCAGACTGGGGGTGGGGGCAGAGCTGCTGGTGGATGTG  
GGTCAGAGGCTGAGAAGAGGGACCCCCTGGCTCAGAGTGCACAGAGATGGCCCTGCCCTCT  
CTGGCCCCCAGAGCAGAGCCCTGCAGGAGGCCCTGGTACTCTCTGACAGAGCCCCATTTGC  
TGCCCCCTTGCCCTTTGCAGAGCTGGTTCTGCCCCCCCAGCAATAA

**Seqüència optimitzada A sense CG**

ATGGCTGCCCTGATGACCCCTGGCACAGGGGCCCCCCTGCCCTGGGGACTTCTCTGGGG  
AGGGCAGCCAGGGCCTGCCTGACCCCAGCCCTGAGCCCAAGCAGCTGCCTGAGCTGATCAG  
AATGAAGAGAGATGGGGGCAGACTGTCTGAGGCTGACATCAGAGGCTTTGTGGCTGCTGTG  
GTGAATGGCTCTGCCAGGGGGCCAGATTGGGGCCATGCTGATGGCCATCAGACTGAGAG  
GCATGGACCTGGAGGAGACCTCTGTGCTGACCCAGGCCCTGGCCAGTCTGGCCAGCAGCT  
GGAGTGGCCTGAGGCCTGGAGACAGCAGCTGGTGGACAAGCACAGCACAGGGGGGGTGGGG  
GACAAGGTGAGCCTGGTGCTGGCCCCCTGCCCTGGCTGCCTGTGGCTGCAAGGTGCCCATGA  
TCTCTGGCAGAGGCCTGGGCCACACAGGGGGCACCCCTGGACAAGCTGGAGAGCATCCCTGG  
CTTCAATGTGATCCAGAGCCCTGAGCAGATGCAGGTGCTGCTGGACCAGGCTGGCTGCTGC  
ATTGTGGGCCAGTCTGAGCAGCTGGTGCCTGCTGATGGCATCCTGTATGCTGCCAGAGATG  
TGACAGCCACAGTGGACAGCCTGCCCTGATCACAGCCAGCATCCTGAGCAAGAAGCTGGT  
GGAGGGCCTGTCTGCCCTGGTGGTGGATGTGAAGTTTGGGGGGGCTGCTGTGTTCCCTAAT  
CAGGAACAAGCTAGGGAGCTGGCCAAGACCCTGGTGGGGGTGGGGGCCAGCCTGGGCCTGA  
GAGTGGCTGCTGCCCTGACAGCCATGGACAAGCCCCCTGGGCAGATGTGTGGGCCATGCCCT  
GGAGGTGGAGGAGGCCCTGCTGTGCATGGATGGGGCTGGCCCCCCTGACCTGAGAGACCTG  
GTGACCACCCTGGGGGGGGCCCTGCTGTGGCTGTCTGGCCATGCTGGCACCCAGGCCCAGG  
GGGCTGCCAGAGTGGCTGCTGCCCTGGATGATGGCAGTGCCCTGGGCAGATTTGAGAGAAT  
GCTGGCTGCCAGGGGGTGGACCCTGGCCTGGCCAGAGCCCTGTGCTCTGGCAGCCCTGCT  
GAGAGAAGACAGCTGCTGCCAGAGCCAGAGAGCAGGAGGAGCTGCTGGCCCCTGCTGATG  
GCACAGTGGAGCTGGTGGAGGCCCTGCCCTGGCCCTGGTGTGCTGCATGAGCTGGGGGCTGG  
CAGAAGCAGAGCTGGGGAGCCCCTGAGACTGGGGGTGGGGGCTGAGCTGCTGGTGGATGTG  
GGCCAGAGACTGAGAAGAGGCACCCCCTGGCTGAGAGTGCACAGAGATGGCCCTGCCCTGT  
CTGGCCCCCAGAGCAGAGCCCTGCAGGAGGCCCTGGTGTGCTGTCTGACAGAGCCCCCTTGC  
TGCCCCCCTGCCCTTTGCTGAGCTGGTGTGCTGCCCCCCCAGCAGTGA

**Seqüència optimitzada D sense CG**

ATGGCTGCTCTGATGACACCTGGAACAGGGGCCCTCCTGCCCTGGGGATTTTTCTGGGG  
AGGGCTCTCAGGGCCTGCCTGATCCATCTCCTGAGCCCAAGCAGCTGCCTGAGCTGATCAG  
AATGAAGAGAGATGGGGGCAGACTGTCTGAGGCTGATATCAGAGGATTTGTGGCTGCTGTG  
GTCAATGGATCTGCCAGGGGGCCAGATTGGAGCCATGCTGATGGCCATTAGACTGAGAG  
GCATGGACCTGGAAGAGACATCTGTGCTGACCCAGGCCCTGGCCAGTCTGGACAGCAGCT  
GGAATGGCCTGAGGCTTGGAGGCAGCAGCTGGTGGATAAGCACTCTACAGGGGGGGTGGGG  
GACAAGGTGTCACCTGGTGTGGCTCCAGCCCTGGCTGCCTGTGGCTGCAAGGTGCCAATGA  
TCTCTGGCAGAGGCCTGGGCCACACAGGGGGCACACTGGATAAGCTGGAATCCATCCCTGG  
CTTCAATGTGATCCAGAGCCCTGAGCAGATGCAGGTCCTGCTGGATCAGGCTGGCTGCTGT  
ATTGTGGGCCAGTCTGAGCAGCTGGTGCCTGCTGATGGAATCCTGTATGCTGCCAGAGATG  
TGACAGCCACAGTGGACAGCCTGCCTCTGATCACAGCCAGCATCCTGAGCAAGAACTGGT  
GGAAGGCCTGTCTGCCCTGGTGGTGGATGTGAAATTTGGGGGAGCTGCTGTGTTCCCAAT  
CAAGAACAGGCCAGAGAGCTGGCCAAGACCCTGGTGGGAGTGGGAGCCTCTCTGGGACTGA  
GAGTGGCTGCTGCCCTGACAGCCATGGATAAGCCCCTGGGAAGATGTGTGGGCCATGCCCT  
GGAAGTGAAGAGGCCCTGCTGTGTATGGATGGGGCTGGACCTCCTGACCTGAGAGATCTG  
GTCACAACACTGGGAGGGGCTCTGCTGTGGCTGTCTGGACATGCTGGAACACAGGCTCAGG  
GGGCAGCTAGAGTGGCTGCTGCACTGGATGATGGCTCTGCCCTGGGGAGATTTGAGAGAAT  
GCTGGCTGCACAGGGGGTGGACCCTGGACTGGCTAGAGCCCTGTGTTCTGGCTCCCCTGCT  
GAGAGAAGGCAGTCTCCTGCCTAGAGCCAGAGAACAGGAAGAAGTCTGGCCCCAGCTGATG  
GCACAGTGGAACTGGTCAGAGCCCTGCCACTGGCCCTGGTGTGCATGAACTGGGAGCTGG  
AAGAAGCAGAGCTGGGGAGCCTCTGAGACTGGGGGTGGGAGCTGAACTGCTGGTGGATGTG  
GGACAGAGACTGAGAAGAGGCACCCCTTGGCTGAGAGTGCACAGAGATGGACCTGCCCTGT  
CTGGCCACAGTCTAGGGCTCTGCAGGAAGCCCTGGTCTGTCTGACAGAGCCCCTTTTGC  
TGCCCCTCTGCCATTTGCTGAACTGGTCTGCCTCCCCAGCAGTGA

# **10. ANNEX II - PUBLICACIÓ DERIVADA DE LA TESI**

---







## Research paper

## Efficacy of adeno-associated virus gene therapy in a MNGIE murine model enhanced by chronic exposure to nucleosides

Ferran Vila-Julià<sup>a</sup>, Raquel Cabrera-Pérez<sup>a</sup>, Yolanda Cámara<sup>a</sup>, Miguel Molina-Berenguer<sup>a</sup>, Silvia Lope-Piedrafita<sup>b,c</sup>, Michio Hirano<sup>d</sup>, Federico Mingozzi<sup>e</sup>, Javier Torres-Torronteras<sup>a,\*</sup>, Ramon Martí<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, and Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> Servei de Resonància Magnètica Nuclear, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Catalonia, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Cerdanyola del Vallès, Catalonia, Spain

<sup>d</sup> Department of Neurology, H. Houston Merritt Neuromuscular Research Center, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, United States

<sup>e</sup> Spark Therapeutics, Philadelphia, PA 19104, United States

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 September 2020

Received in revised form 5 November 2020

Accepted 5 November 2020

Available online xxx

## Keywords

MNGIE

Gene therapy

Nucleosides

Mitochondrial disease

Thymidine phosphorylase

## ABSTRACT

**Background:** Preclinical studies have shown that gene therapy is a feasible approach to treat mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). However, the genetic murine model of the disease (Tym<sup>0</sup>/Upp1 double knockout, dKO) has a limited functional phenotype beyond these metabolic imbalances, and so the studies showing efficacy of gene therapy have relied almost exclusively on demonstrating correction of the biochemical phenotype. Chronic oral administration of thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) to dKO mice deteriorates the phenotype of the animals, providing a better model to test therapy approaches.

**Methods:** dKO mice were treated with both dThd and dUrd in drinking water from weaning until the end of the study. At 8 - 11 weeks of age, mice were treated with several doses of adeno-associated virus (AAV) serotype 8 vector carrying the human *TYMP* coding sequence under the control of different liver-specific promoters (TBG, AAT, or HLP). The biochemical profile and functional phenotype were studied over the life of the animals.

**Findings:** Nucleoside exposure resulted in 30-fold higher plasma nucleoside levels in dKO mice compared with non-exposed wild type mice. AAV-treatment provided elevated TP activity in liver and lowered systemic nucleoside levels in exposed dKO mice. Exposed dKO mice had enlarged brain ventricles (assessed by magnetic resonance imaging) and motor impairment (rotarod test); both were prevented by AAV treatment. Among all promoters tested, AAT showed the best efficacy.

**Interpretation:** Our results show that AAV-mediated gene therapy restores the biochemical homeostasis in the murine model of MNGIE and, for the first time, demonstrate that this treatment improves the functional phenotype.

**Funding:** This work was funded in part by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, and the Generalitat de Catalunya. The disclosed funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

© 2020

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [javier.torres@vhir.org](mailto:javier.torres@vhir.org) (J. Torres-Torronteras); [ramon.marti@vhir.org](mailto:ramon.marti@vhir.org) (R. Martí)

## Research in context

### Evidence before this study

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is a fatal metabolic disease caused by mutations in the nuclear gene *TYMP* that encodes thymidine phosphorylase. In patients, thymidine phosphorylase dysfunction causes accumulation of the nucleosides thymidine and deoxyuridine, which interferes with mitochondrial DNA replication. Hence, all therapy approaches for MNGIE are addressed to reach permanent reduction of these toxic metabolites. Over the last years, several preclinical studies have demonstrated that gene therapy is a feasible strategy for this disorder. Transduction of hematopoietic progenitors with the correct version of the gene using lentiviral vectors, or the liver, using an adeno-associated virus (AAV) vector, resulted in effective and sustained restoration of nucleoside homeostasis in the *Tymp/Upp1* double knockout murine model of this disorder. However, this animal model does not recapitulate the clinical manifestations of the disease, and all evidence so far collected supporting gene therapy for MNGIE relies almost exclusively on demonstrating correction of the biochemical phenotype in mice.

### Added value of this study

Previous studies demonstrated that challenging the MNGIE mouse model with a chronic oral administration of the toxic nucleosides exacerbated the model leading to the manifestation of neurological phenotype and thus providing a better tool to test therapeutic intervention. In this study, we show that AAV-mediated gene therapy prevents the enlargement of brain ventricles and the neuromotor dysfunction observed in the mice. Hence, we prove that liver-targeted gene therapy using an AAV vector prevents the manifestation of a neurological phenotype beyond correcting the biochemical nucleoside imbalance. This is the first time liver-targeted AAV-mediated gene therapy for MNGIE shows efficacy on clinical parameters in the animal model of the disease, which constitutes an important step towards the translation of this therapy to patients.

### Implications of all the available evidence

At present, hematopoietic stem cell transplantation and liver transplantation are the only available therapies for MNGIE patients. However, both treatments are constrained by the availability of a suitable donor and involve complex medical interventions associated to life-threatening risks. Gene therapy may constitute a safer alternative, and this study provides evidence that liver targeted AAV-mediated gene therapy is effective on the neurological phenotype in the enhanced animal model of the disease. This will support conducting clinical studies that will bring this potential treatment closer to patients.

## 1. Introduction

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is caused by mutations in the nuclear gene *TYMP* [1], which lead to a deficiency of thymidine phosphorylase (TP) activity and systemic accumulation of its substrates, the nucleosides thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) [2,3]. dThd and dUrd accumulation causes an imbalance in the mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) pool that interferes with mitochondrial DNA (mtDNA) replication, thereby inducing mtDNA depletion, multiple deletions, and point mutations [4-8].

The main clinical features of MNGIE are progressive gastrointestinal dysmotility, cachexia, ptosis, ophthalmoplegia or ophthalmoparesis, demyelinating peripheral neuropathy, symmetrical distal weakness, and diffuse leukoencephalopathy on brain MRI. Disease onset is usually between the first and fifth decades, in most cases before the age of 20 years, and the condition progressively degenerates, causing premature death of affected patients usually during the third to fourth decade of life [9].

Several therapeutic strategies have been proposed for MNGIE, all of them addressed to reducing the toxic nucleoside accumulation [10]. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation was the first treatment providing a permanent nucleoside reduction and clinical improvement or stabilization in patients [11,12]. However, it is an aggressive therapy associated with a high mortality risk due to transplant-related complications, which are aggravated in MNGIE patients by the poor clinical condition when most are treated [13]. More recently, orthotopic liver transplantation was proposed as an alternative option [14], and the reported cases indicate that successful engraftment results in a sustained nucleoside reduction [15-18]. However, liver transplantation is also an aggressive intervention, and it is constrained by a limited supply of donors.

Over the last few years, several preclinical studies have proven the effectiveness of lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy or liver-targeted adeno-associated virus (AAV) vector gene therapy to correct MNGIE biochemical disarrangements in a *Tymp/Upp1* double knockout (dKO) mouse model of the disease [5,19-24]. However, as the dKO mouse model has a limited and elusive functional phenotype except for its clear metabolic imbalances, these preclinical studies have relied almost exclusively on demonstrating correction of the biochemical imbalances caused by the lack of TP activity. It has been shown that chronic oral administration of dThd and dUrd to dKO mice significantly enhances the phenotype beyond biochemical derangements and provides a better model to test therapy approaches [25]. Taking advantage of this improved model, we show here that the liver-targeted AAV gene therapy not only corrects the biochemical imbalances of the nucleoside-stressed model, but also prevents other functional changes such as those related to its neurological phenotype.

## 2. Methods

### 2.1. Vector construction, production, and titration

The human coding sequence of *TYMP* (hcTYMP) was cloned in three different vectors (AAV-TBG, AAV-AAT, and AAV-HLP) and packaged in AAV8 serotype as previously described [19]. AAV-TBG contained hcTYMP under regulation of the tyrosine binding globulin (TBG) promoter in a single-stranded configuration. AAV-AAT contained hcTYMP under regulation of the  $\alpha$ -1-antitrypsin promoter and the apolipoprotein E hepatic control region (ApoE-AAT cassette) in a single-stranded configuration. AAV-HLP contained hcTYMP under regulation of the hybrid liver-specific promoter, which is composed of an abbreviated form of the ApoE-AAT cassette [26] in a self-complementary configuration. For construction of AAV-HLP, the pAV-HLP-Luc plasmid was provided by Dr. Nathwani's group (University College London Cancer Institute, London, United Kingdom) and the luciferase gene was replaced by the hcTYMP sequence. All vectors were produced and titrated as indicated elsewhere [19].

### 2.2. Animal procedures

All animal procedures were conducted in accordance with the rules established by the *Generalitat de Catalunya* for the Care and Use of Laboratory Animals and were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines. The protocols were approved by the Ethics Committee for

Animal Experimentation of the Vall d'Hebron Research Institute (Permit Number: 14–06).

A double knockout mouse for the genes *Tymp* and *Upp1* previously described was used for this study [5]. AAV transduction efficiency in mice is higher in males than females [27]. Thus, to avoid sex-related variation in the results, only male animals were used in this study.

For chronic oral nucleoside exposure (“exposed” mice), the animals’ drinking water was supplemented with 16.6 g/L of dThd and dUrd (68.6 mM dThd and 72.3 mM dUrd) from weaning up to the end of the study (22-month-old mice) [25]. Mice that were not exposed to nucleoside administration are designated as “naïve” in this study.

To study pharmacokinetics (PK) following acute nucleoside administration (peak plasma concentration, area under the curve [AUC], time to reach plasma concentration in naïve wild type [WT] animals), a single dose was administered by oral gavage (10 µL/g body weight of 16.6 g/L of dThd and dUrd aqueous solution, ie, 166 mg dThd + 166 mg dUrd/kg body weight). Blood samples were collected immediately before nucleoside administration, and at 30 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, 3 h, 5 h, and 8 h after administration. In the PK study, mice were deprived of access to drinking water during the first 3 h after gavage.

To detect the influence of possible metabolic adaptation on PK in chronically dThd/dUrd-treated mice (exposed group), acute dThd/dUrd administration was studied under two different conditions: mice without chronic oral dThd/dUrd treatment (naïve group), and mice already receiving chronic dThd/dUrd treatment (exposed group). In this latter case, dThd/dUrd was withdrawn from drinking water 24 h before acute administration for the PK study.

Therapeutic vectors were administered to 8- to 11-week-old dKO mice in a single intravenous injection (tail vein) of AAV-TBG at doses (in vector genomes per kg, vg/kg) of  $5 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$  and  $10^{13}$ , and AAV-AAT or AAV-HLP, both at doses of  $2 \times 10^{12}$  and  $10^{13}$ .

Blood samples from live animals were collected from the saphenous vein using EDTA capillaries (Microvette 200K3E, Sarstedt). At the end of the study (age 22 months), mice were euthanized by cervical dislocation. Heart blood was immediately collected in EDTA-treated tubes, and tissues (liver, brain, small intestine and gastrocnemius skeletal muscle) were excised and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Before analysis, mouse tissues were ground to a fine powder with a ceramic mortar and pestle without defrosting in liquid nitrogen.

### 2.3. TP activity and nucleoside determination

Plasma dThd and dUrd concentrations were determined by HPLC-UV, as previously described [22]. For TP activity, 100–200 µg of pulverized tissue was homogenized with a plastic pestle in 800 µL of lysis buffer. Homogenates were centrifuged at 20,000 x g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the supernatant protein concentration was measured [28], and TP activity was determined as described elsewhere [29].

For dThd and dUrd quantification in tissue, 100–200 µg of pulverized samples was homogenized with a plastic pestle in lysis buffer with addition of 1 µM internal standard (isotope-labeled dThd:  $^{13}\text{C}_{10}$ - $^{15}\text{N}_2$ -dThd) and TP activity inhibitors to prevent in vitro degradation of nucleosides in homogenates: 100 µM of 5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl) methyl] uracil hydrochloride (strong TP-specific inhibitor that does not inhibit uridine phosphorylase (UP), used in liver homogenates containing high TP activity derived from AAV transduction) or 100 µM 6-amino-5-bromouracil (TP and UP inhibitor) and 100 µM tetrahydrouridine (cytidine deaminase inhibitor), used in small intestine homogenates containing high TP and UP activity) [30]. Homogenates were centrifuged at 20,000 x g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and protein concentration of the supernatant was measured [28]. The supernatant was deproteinized by ultrafiltration (10 kDa Amicon Ultra filters; Merck Milli-

pore) at 14,000 x g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The ultrafiltrate was later used to measure nucleosides by LC-MS/MS (liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry). Components of the sample were resolved and detected as previously described [23]. Serial dilutions of dThd and dUrd standards (0.5–20 µM) in lysis buffer and 1 µM of internal standard were processed in parallel to generate calibration curves. dThd and dUrd concentrations in the samples were obtained from interpolation of the peak areas relative to the internal standard in the calibration curve.

### 2.4. Vector copy number determination

DNA was isolated with phenol-chloroform from approximately 25 mg of frozen liver and dissolved in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Vector genome copies per cell were quantified by qPCR on the ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems). hcTYMP DNA copy number was quantified using the predesigned TaqMan MGB expression assay Hs00157317.m1 and referred to the murine single-copy nuclear gene *Ang1* using the predesigned TaqMan MGB gene expression assay Mm00833184.s1 as previously described [19]. Quantifications were based on a standard curve prepared with different dilutions of plasmids containing hcTYMP DNA or a specific region of the *Ang1* gene.

### 2.5. Motor performance

Motor coordination, balance and exercise tolerance were assessed in 25-week-old mice by testing their time to fall in a rotarod apparatus (Ugo Basile Mouse Rota-Rod). The protocol included three training sessions of 2 min each at a constant 4-rpm speed prior to the test. The test session was then started at a speed of 4 rpm for 15 s, followed by a constant acceleration rate of 1 rpm/s for 45 s. Three test sessions were carried out with each mouse and the three time-to-fall values were recorded and averaged [25].

### 2.6. Magnetic resonance imaging

Eighteen months-old mice were anesthetized with 4% (v/v) and maintained with 1.5% (v/v) isoflurane in  $\text{O}_2$  at 1 L/min. Mice were placed in prone position on a water-jacketed bed to maintain body temperature ( $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and immobilized with bite-bar and ear-bars. Stable respiration rate (50–80 bpm) and rectal temperature were monitored (SA Instruments, Stony Brook, NT).

$^1\text{H}$ -MRI studies were performed at the joint nuclear magnetic resonance facility of the Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red—Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) (Cerdanyola del Vallès, Catalonia), Unit 25 of NANBIOSIS. Experiments were conducted on a 7T Bruker BioSpec 70/30USR scanner (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany) equipped with a 72-mm inner diameter linear volume coil as a transmitter and a dedicated mouse brain surface coil as a receiver. MRI data were acquired and processed on a Linux computer using Paravision 5.1 software (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany).

Low-resolution  $\text{T}_2$ -weighted fast spin-echo images were initially obtained in axial, sagittal, and coronal planes for use as reference scout images. The following imaging parameters were applied: TE (effective echo time) 36 ms; TR (repetition time) 2 s; ETL (echo train length) 8; FOV (field of view)  $1.92 \times 1.92\text{cm}^2$ ; MTX (matrix size)  $128 \times 128$ ; ST (slice thickness) 1 mm; gap (gap between slices) 0.1 mm; NS (number of slices) 14 axial, 9 sagittal, 5 coronal; NA (number of averages) 1; and Expt (experiment time) 24 s per orientation.

$\text{T}_2$  maps were acquired using a multi-spin multi-echo sequence.  $\text{T}_2$ -weighted images at 24 different TE values between 10 and 240 ms were acquired, with TR 3 s, FOV  $1.92 \times 1.92\text{cm}^2$ , MTX  $128 \times 128$ ,

NS 8, ST 1 mm, and gap 0.1 mm, covering the whole brain excluding the olfactory bulb and cerebellum (Supp. Figure 6a), with Expt 4 min 48 s.

Voxel-wise  $T_2$  relaxation maps were calculated using Paravision 5.1 software. Regions of interest corresponding to the total brain and excluding ventricular areas were manually outlined for each slice and the mean  $T_2$  region values were calculated for each mouse.

For ventricular volume measurement, brain volume was manually outlined in each slice. Within the selected brain region, ventricular pixels were automatically pre-defined on  $T_2$  maps as pixels having  $T_2$  values above 60 ms. The analysis was reviewed and non-ventricular regions were manually removed. The sum of ventricular pixels in all slices was then multiplied by the voxel volume ( $0.15 \times 0.15 \times 1 \text{ mm}^3$ ) to provide the total ventricular volume for each mouse.

### 2.7. Mitochondrial isolation and dNTP determination

Liver and brain mitochondria were isolated and dNTPs were extracted as previously described [6,22]. For dNTP quantification, dry extracts were thawed and re-dissolved in 40  $\mu\text{L}$  of 40 mM Tris-HCl, pH 7.4. Mitochondrial dNTP content was determined using the previously described polymerase-based method [31] with some modifications [19].

### 2.8. Mitochondrial DNA copy number analysis

Total DNA was isolated from approximately 25 mg of pulverized frozen tissue with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) and dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 8). MtDNA copy number was quantified by qPCR on the ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems) using a probe targeted to the mitochondrial gene *mt-Rnr2* (encoding the 16S rRNA) and referred to the nuclear gene *Ang1*, following the protocol detailed elsewhere [32].

### 2.9. Histochemical staining of small intestine

Longitudinal sections of jejunum were analysed using the adapted "Swiss roll" technique [33]. Jejunum sections were fixed in 4% neutral buffered formalin and embedded in paraffin for histological examination. Three- $\mu\text{m}$ -thick slices were routinely stained with Masson's trichrome. Images were taken using a FSX100 fluorescence microscope and the software FSX-BSW (Olympus, Tokyo, Japan).

### 2.10. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6 program (GraphPad Software, Inc.). For multiple comparisons (multiple comparisons with one reference group, and multiple comparisons of all groups compared with each other) the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test was used. When the only interest was to compare two groups defined by only one variable (e.g., exposed group vs. non-exposed group), we used the Mann-Whitney  $U$  test. In any case, tests used are always indicated in the figure legends. For statistical purposes, undetectable values were considered as zero. Nucleoside PK parameters, including peak plasma concentration, AUC, and time to reach plasma WT concentration, were calculated from the graphical curves obtained by plotting nucleoside plasma concentrations vs time, defined by connecting adjacent measurements with straight lines, and taking as baseline the mean plasma nucleoside concentration at time 0 h in naïve WT mice.

### 2.11. Role of funding source

The disclosed funders had no role in study design, data collection and analysis, interpretation, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## 3. Results

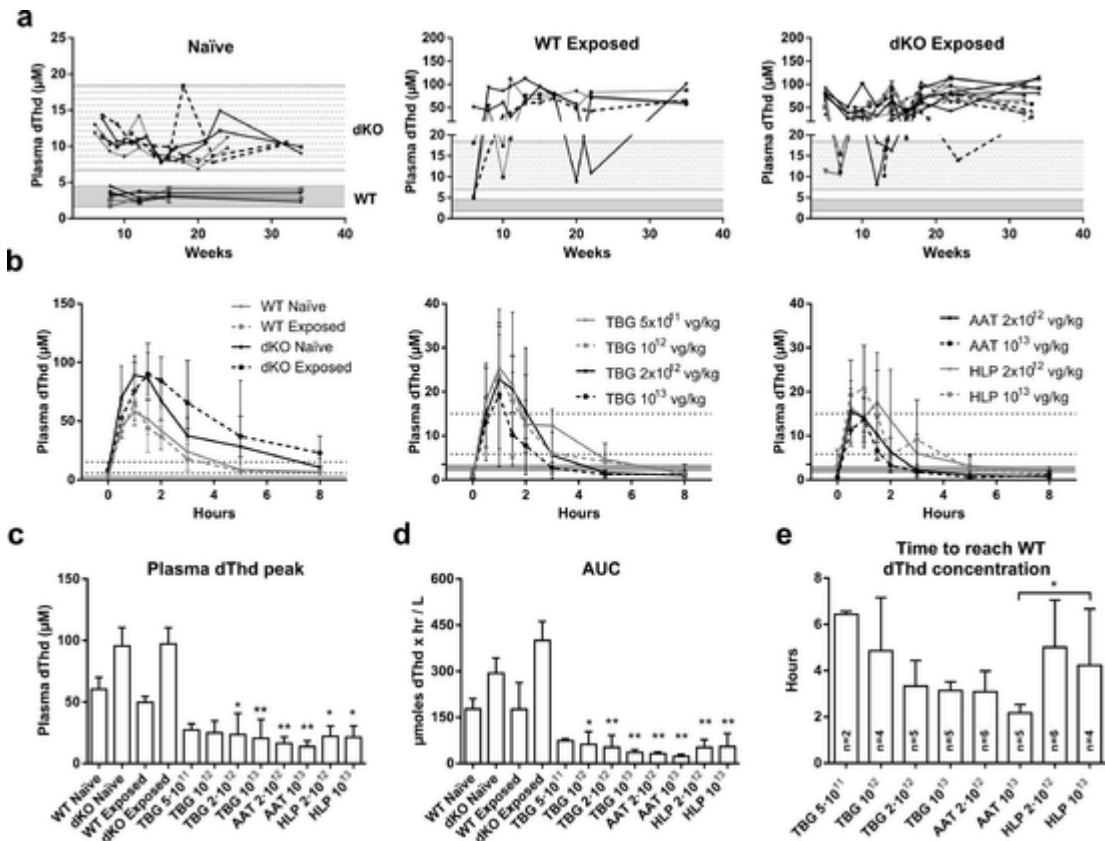
### 3.1. Pharmacokinetics of dThd and dUrd in the murine model

In agreement with previous reports [19-24], in the absence of oral nucleoside administration (naïve mice), circulating dThd and dUrd concentrations were around 3-fold higher in dKO mice than in WT mice (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). A marked increase in plasma dThd and dUrd concentrations above normal WT levels was observed in the exposed groups. When the time of blood sample collection was not considered, plasma dThd and dUrd concentrations showed wide dispersion in the exposed groups (data not shown). This variability was greatly reduced after changing the protocol and collecting all blood samples between 8 and 9 am (8- to 30-fold increase in exposed WT mice, and 13- to 26-fold increase in exposed dKO mice) (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1). As mice were exposed to dThd and dUrd in drinking water ad libitum, it was not possible to determine the time of the last intake before blood collection. This may account for the wide, randomly distributed variation in plasma concentrations; that is, time differences between the last water intake and sample collection.

Thus, we decided to explore a more controlled set of parameters, by studying nucleoside PK in 35 to 40 week-old mice after a single dThd/dUrd administration by oral gavage in naïve WT and dKO mice. We also studied exposed WT and dKO mice to detect whether a possible metabolic adaptation in response to chronic dThd and dUrd exposure influenced PK. After the single oral dose, plasma concentrations rose above naïve dKO levels, reaching a peak value between 1 and 1.5 h after oral gavage (Fig. 1b and Supplementary Fig. 2a). Thereafter, deoxyribonucleoside (dN) levels rapidly declined, even in dKO mice, which lack the required catabolic enzymes, owing to urinary excretion (data not shown). Eight hours after oral administration, dThd and dUrd plasma levels remained above normal plasma levels in all groups. Peak concentrations (Fig. 1c and Supplementary Fig. 2b) and AUCs (Fig. 1d and Supplementary Fig. 2c) showed a clear tendency to be higher in dKO mice than WT mice, in both the naïve and exposed groups, respectively. We also found that AUC values were higher in exposed dKO than in naïve dKO mice (Fig. 1d and Supplementary Fig. 2c).

### 3.2. AAV-TYMP treatment limits nucleoside stress in chronically dThd/dUrd-exposed dKO mice

Exposed dKO mice were treated with three different liver-targeted AAV vectors carrying hcTYMP (AAV-TBG, AAV-AAT, or AAV-HLP) at different doses. Plasma dThd and dUrd monitoring over 35 weeks showed the following: although AAV treatment failed to reduce circulating levels of these nucleosides at most time points, the frequency of randomly distributed samples in which nucleoside concentrations decreased to levels within the range of naïve dKO mice (Supplementary Fig. 3) was higher than that of untreated exposed dKO mice (Fig. 1a). As the last nucleoside intake (in drinking water) before blood sample collection might have been interfering with detection of the effect of AAV treatment on dN concentration, we analyzed the effect of AAV treatment on PK parameters in gavage-exposed dKO mice (Fig. 1b-e). Before gavage dosing, plasma dThd and dUrd concentrations in all AAV-treated mice but one were in the WT range or below (dThd, 1.9–3.5  $\mu\text{M}$ ; dUrd, 2.5–4.2  $\mu\text{M}$ ). It should be noted that the group of exposed mice had been deprived of oral dThd and dUrd in drinking water 24 h before PK assessment. AAV treatment reduced peak dThd concen-



**Fig. 1.** Effect of AAV treatment on dThd pharmacokinetics. **a)** Plasma dThd concentration in WT and dKO mice exposed to dThd and dUrd supplementation in drinking water starting from weaning (exposed group), or without exposure (naïve group). The monitored range encompasses 5 to 34 weeks of age. Each symbol and line represents a single mouse. Gray dotted and shadowed areas indicate the concentration range in naïve dKO and WT groups, respectively. **b)** Plasma dThd concentrations before (0 h) and after a single administration of dThd and dUrd by oral gavage (166 mg/kg each) in naïve and exposed WT mice, naïve and exposed dKO mice, and exposed dKO mice previously treated with different doses of AAV-TBG, AAV-AAT and AAV-HLP vectors. Mice were 35 to 45 weeks old at the time of the experiment. Each point represents mean  $\pm$  range. White and gray areas between dotted lines indicate the concentration range in naïve dKO and WT groups at time zero, respectively. **c, d and e)** PK results (mean  $\pm$  SD) obtained from experiments depicted at **b**. Sample sizes in panels **b** to **e** are: naïve WT,  $n = 8$ ; naïve dKO,  $n = 6$ ; exposed WT,  $n = 5$ ; exposed dKO,  $n = 7$ ; TBG-treated mice with  $5 \times 10^{11}$  vg/kg  $n = 2$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n = 4$ ,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 5$ , and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 5$ ; AAT-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 5$ ; HLP-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ . Asterisks indicate statistically significant differences ( $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ; panels **c** and **d**, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed; panel **e**, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with each other). AUC, area under the curve.

trations to well below the peak concentrations observed in exposed dKO mice, regardless of the vector construct or dose used, although statistical significance was not reached for the two AAV-TBG lowest doses (Fig. 1c). AAV treatment led to even more pronounced reductions in the AUC (Fig. 1d). In contrast to what occurred in AAV-untreated mice, which did not reach WT nucleoside levels after gavage nucleoside administration over 8 h of monitoring (Fig. 1b), all AAV-treated exposed dKO mice reached WT levels in less than 8 h (Fig. 1e). A dose-dependent effect in the time reduction to reach WT dThd concentration was observed with all vectors; a similar, but less marked dose-dependent effect was observed on peak dThd concentration and dThd AUC. Comparison between the different vectors showed that AAV-AAT had the most pronounced effect on dThd PKs.

The greatest effect was achieved with AAV-AAT at  $10^{13}$  vg/kg, which reduced plasma dThd concentration to  $<3.5 \mu\text{M}$  in a mean of 2.2 h (range 1.8–2.6 h) after oral gavage. Mice treated with  $10^{13}$  vg/kg of AAV-AAT also showed the lowest mean dThd peak concentration ( $13.8 \mu\text{M}$ , range 5.5–16.9) and the lowest mean dThd AUC ( $23.8 \mu\text{moles dThd} \times \text{hour/L}$ , range 15.8–29.3). Similar effects of AAV treatment on PK were observed for dUrd (Supplementary Fig. 2).

Nucleoside-exposed mice were treated with dThd/dUrd in drinking water from weaning until the end of the study (at 22 months old). At this point, mice were killed and dThd and dUrd levels were analyzed in plasma and liver (AAV target organ), as well as brain and small intestine

(two affected organs in MNGIE patients). Chronic oral nucleoside exposure resulted in increased dThd median levels in all tissues in WT mice (plasma 5-fold, liver 2-fold, brain 4-fold, and small intestine 90-fold, as compared with median levels in naïve WT group), and showed a higher increase in dKO mice (plasma 20-fold, liver 10-fold, brain 7.5-fold, and small intestine 275-fold, as compared with median levels in naïve WT group) (Fig. 2). In addition, AAV-treatment reduced dThd and dUrd levels in nucleoside-exposed mice at the end of the study in liver (reductions compared to exposed dKO AAV-untreated, with levels comparable to those of WT naïve mice) and in brain (reductions compared to untreated exposed dKO AAV, with levels comparable to those of exposed WT mice in all groups and doses except the lowest AAV-TBG dose). In plasma, reductions were especially prominent in mice treated with the AAV-AAT vector (and reached statistical significance for the dose  $2 \times 10^{12}$  vg/kg), whereas there was no effect in small intestine with any treatment. The greatest reductions were obtained for the AAV-AAT vector in plasma, liver, and brain. Similar results were observed for the dUrd concentrations (Supplementary Fig. 4).

### 3.3. AAV-TYMP treatment induces increased TP activity in liver

Chronic nucleoside exposure induced increased TP activity in liver tissue in WT mice (mean value 39 nmoles Thy/h/mg prot in naïve WT, and 112 in exposed WT), and in dKO mice (mean value 1.2 in naïve

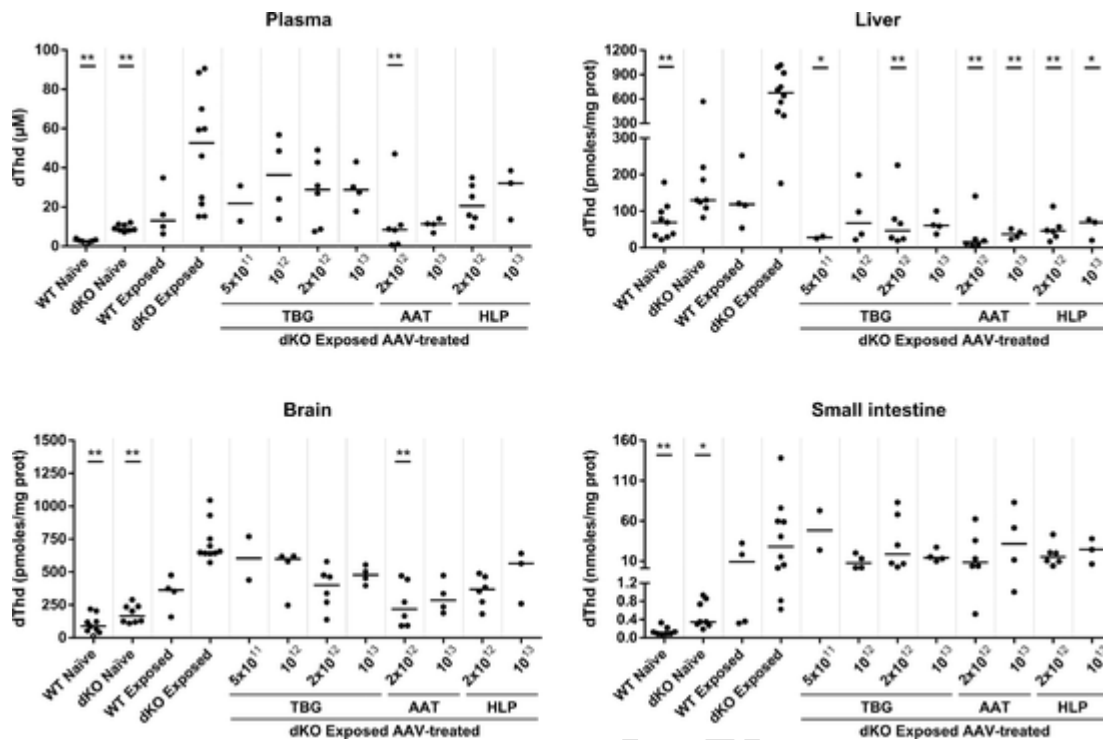


Fig. 2. Effect of AAV treatment on dThd levels in 22-month-old mice. Plasma, liver, brain, and small intestine dThd concentration in WT ( $n = 7-9$ ) and dKO ( $n = 8$ ) naïve mice, WT ( $n = 4$ ) and dKO ( $n = 10$ ) exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAV doses (TBG-treated mice with  $5 \times 10^{11}$  vg/kg  $n = 2$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n = 4$ ,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; AAT-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; HLP-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 3$ ). Horizontal lines indicate the median concentration for each group. Asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed).

dKO, and 9.9 in exposed dKO (Fig. 3a), but not in small intestine, brain, or skeletal muscle (Supplementary Fig. 5). Treatment with AAV vectors provided TP activity to liver of exposed mice in a dose-dependent manner (Fig. 3b). AAV-AAT was the most effective vector in providing TP activity to liver, in agreement with its nucleoside reduction. At the highest dose ( $10^{13}$  vg/kg), liver TP activity mean values in exposed mice increased 40- to 75-fold compared to WT values:  $2091 \pm 140$  nmoles Thy/h/mg prot for AAV-TBG (mean  $\pm$  SD);  $3031 \pm 509$  for AAV-AAT and  $1535 \pm 456$  for AAV-HLP (Fig. 3b).

Vector copy number (VCN) increased in liver in a dose-dependent manner (Fig. 3c). In an attempt to compare the efficacy of the promoters carried by the three vectors, we normalized TP activity per VCN, and the results revealed that TP/VCN ratios were not constant for each vector, but declined as VCN increased (Fig. 3d). This apparent "saturation of efficacy" makes it difficult to compare the efficacies of different promoters, but the fact that the highest TP/VCN ratios were always observed with the AAV-AAT vector for all different VCN values (Fig. 3d), suggests that AAT was the most effective promoter among those tested. The TP vs VCN distribution was adjusted to the nonlinear function:  $Y = \text{intercept} + \text{slope} \times \log(X)$ , where Y is TP activity and X is VCN. Semilogarithmic transformation of the function showed that the highest slope among the three vectors corresponded to AAV-AAT ( $p < 0.05$ , extra sum of squares F-test).

Although all the promoters used here are liver-specific, AAV treatment provided TP activity to small intestine in exposed dKO mice, as well as skeletal muscle treated with the highest vector doses, and brain in a few individual mice. AAV-induced TP activities did not reach levels above WT values in non-hepatic tissues except in a single skeletal muscle sample (Supplementary Fig. 5).

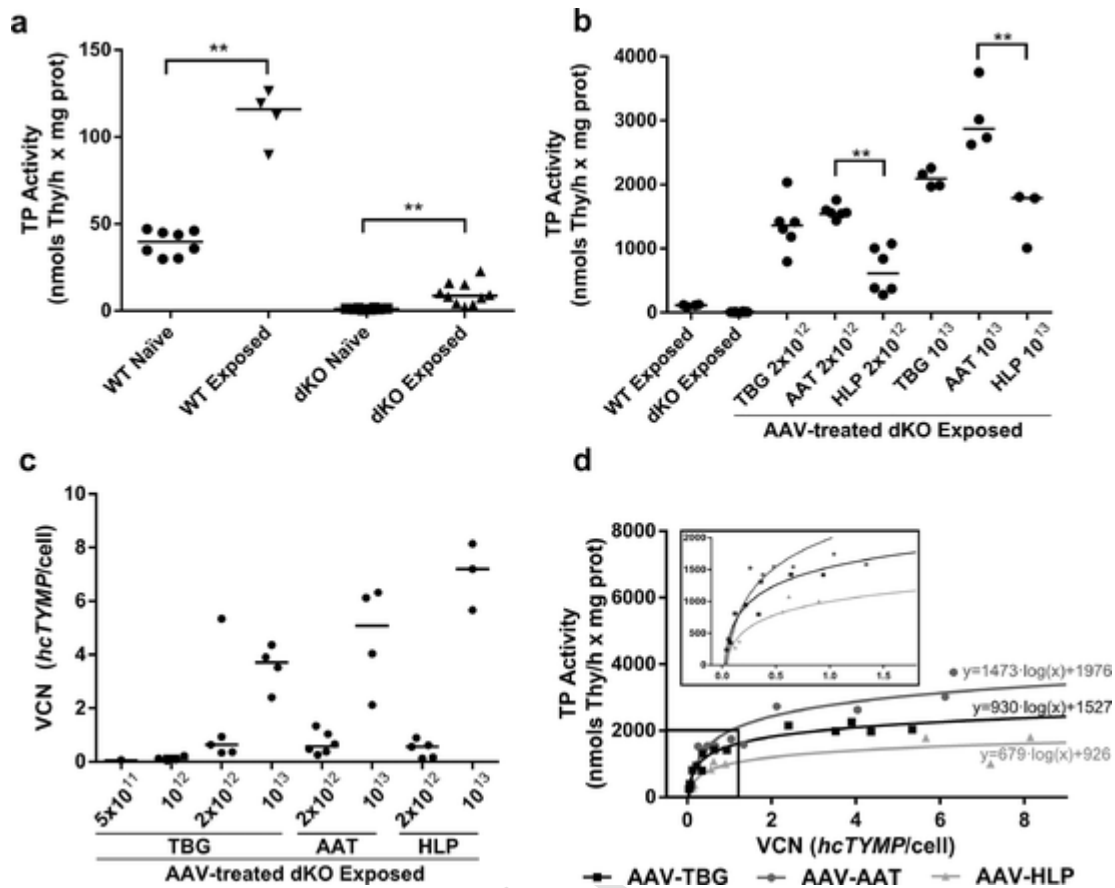
#### 3.4. Histological analysis of small intestine and mtDNA copy number

Histological analysis of the small intestine (Masson's trichrome staining) did not reveal any detectable abnormalities induced by nucleoside exposure in this tissue. Also, we could not find that nucleoside exposure induced mtDNA depletion in brain and small intestine. (Supplementary figure 6).

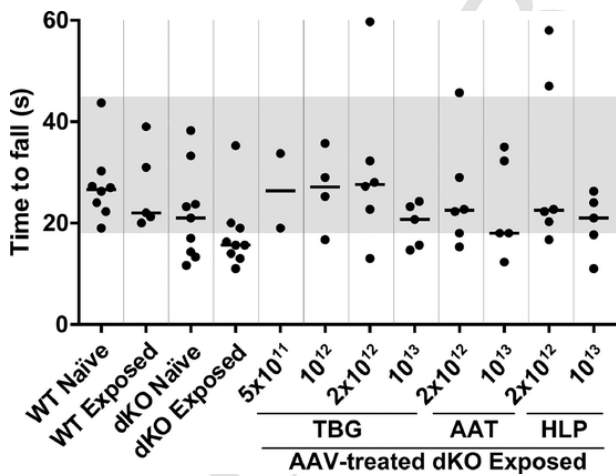
#### 3.5. Effect of the AAV-TYMP treatment on neurological phenotype

Motor coordination, balance and exercise tolerance were determined using the rotarod performance test in 25 week-old mice (Fig. 4). The performance in this test can be influenced by impaired function of the skeletal muscles and/or the central nervous system. Multiple comparison analysis of all groups represented in Fig. 4 (Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn's multiple comparisons test) did not detect statistical differences for any group, probably due to the high number of groups. However, when we only analysed the effect of nucleoside exposition, we observed that exposed dKO mice had a reduced time to fall, as compared with WT naïve mice ( $p = 0.006$ , Mann-Whitney U test) (Fig. 4). In AAV-treated mice, rotarod performance varied widely, but in most AAV-treated mice (69%; 27 out of 39) was within or above the naïve WT normal range (19–44 s), whereas only 33% (3 out of 9) of exposed dKO mice showed a lengthier time to fall.

All MNGIE patients have diffuse leukoencephalopathy on brain MRI [9], and chronic oral exposure to dThd and dUrd enhances leukoencephalopathy in the dKO murine model [25]. We performed brain MRI studies in 84-week-old naïve and exposed WT and dKO mice. Larger T2-weighted hyperintense areas (indicative of cerebrospinal fluid) were found in exposed dKO mice than in naïve dKO, naïve WT, or exposed WT mice (Fig. 5a and Supplementary Fig. 7). In contrast to what was



**Fig. 3.** TP activity in liver after AAV treatment. Liver TP activity in (a) WT ( $n = 8$ ) and dKO ( $n = 8$ ) naïve mice and in untreated WT ( $n = 4$ ) and dKO ( $n = 10$ ) exposed mice. (b) Liver TP activity in untreated WT and dKO exposed mice and in dKO exposed mice treated with different AAVs doses (TBG-treated mice with  $5 \times 10^{11}$  vg/kg  $n = 2$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n = 4$ ,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; AAT-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; HLP-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 3$ ). (c) Liver vector copy number (VCN) in AAV-treated dKO exposed mice. TBG-treated mice with  $5 \times 10^{11}$  vg/kg  $n = 1$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n = 4$ ,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 5$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; AAT-treated mice with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; HLP-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 5$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 3$ . Horizontal lines indicate the median for each group. (d) Non-linear regression of liver TP activity (data from panel b) vs. liver VCN (data from panel c) in AAV-treated mice ( $Y = \text{intercept} + \text{slope} \times \log(X)$ ). Note that the low VCN region is magnified to facilitate observation of the differences between the three vectors. Asterisks indicate statistically significant differences ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; for panel a, Mann-Whitney U test; for panel b, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with each other, two different analyses for each dose).

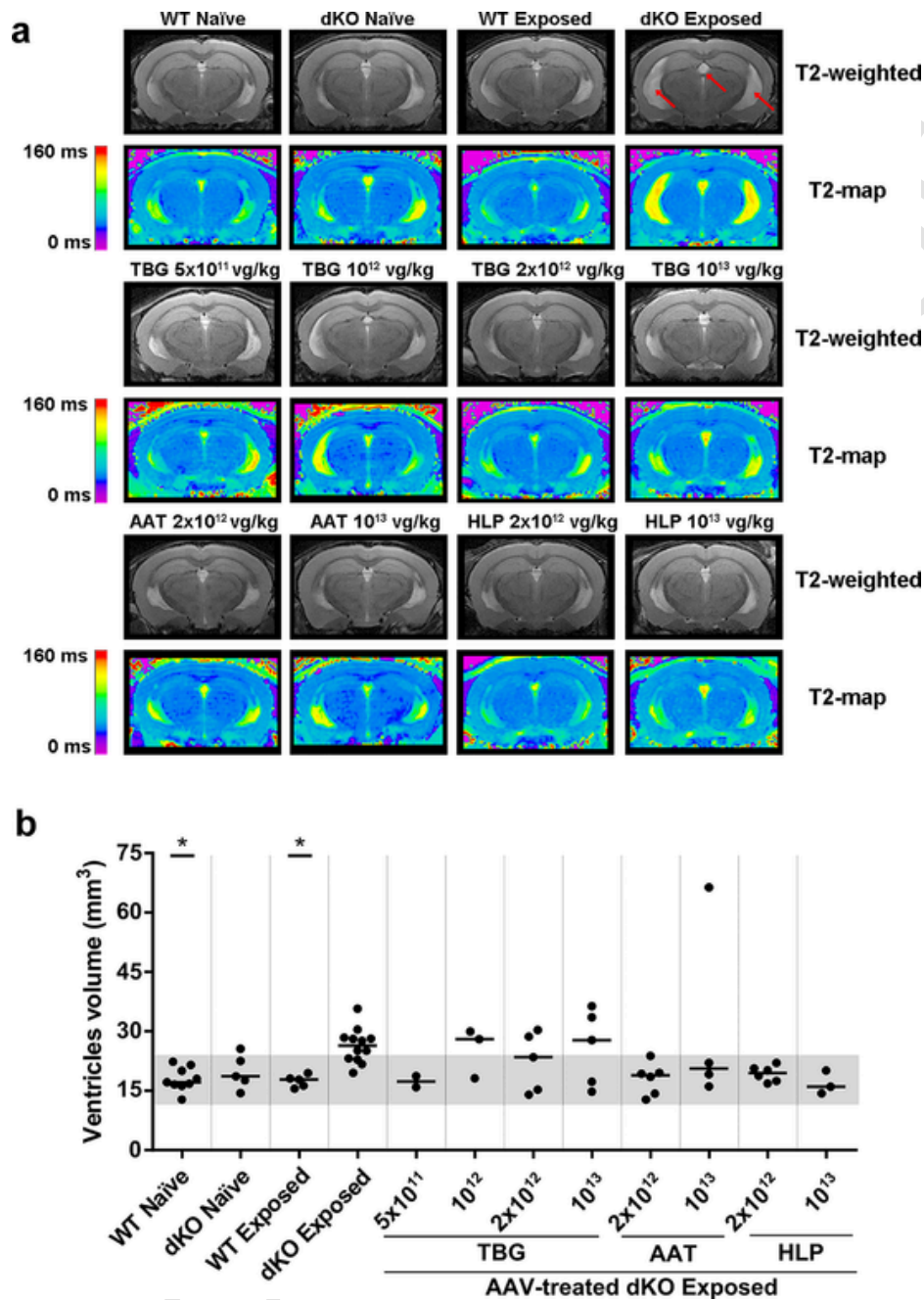


**Fig. 4.** Motor function. Motor function assessed by rotarod test in 25-week-old WT and dKO naïve and exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAVs doses. Horizontal lines show median time to fall in each group. Gray areas indicate the range of values in the naïve WT group. No statistical differences found, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed).

reported in the former study of nucleoside exposed dKO mice, we did not find leukoencephalopathy in our experimental setting, probably because of different magnetic resonance protocols [25]. Hyperintensity was mainly located in the third and lateral ventricles, suggesting ventricular enlargement. The volume of the third and lateral ventricles was quantified using T2 maps, and it was significantly greater in exposed dKO mice than in naïve WT mice whereas it was unchanged in both naïve dKO and exposed WT mice (Fig. 5b). AAV-AAT and AAV-HLP treatment prevented ventricular enlargement in exposed dKO mice: most animals treated with these vectors had normal ventricular volumes, with the exception of one mouse treated with  $10^{13}$  vg/kg AAV-AAT that developed hydrocephalus. In contrast, AAV-TBG failed to prevent ventricular enlargement in most cases (Fig. 5b).

Ventricular volumes at 84 weeks of age significantly correlated with brain dThd levels at the end of the study (94 weeks) in all groups (Spearman  $r = 0.324$ ,  $p = 0.014$ ,  $n = 57$ , excluding 2 ventricular volume extreme values;  $r = 0.358$ ,  $p = 0.005$ ,  $n = 59$ , including all values) and with rotarod test performance (Spearman  $r = -0.348$ ,  $p = 0.0068$ ,  $n = 59$ , excluding two ventricular volume extreme values). Ventricular volumes did not significantly correlate with plasma or liver dThd levels.



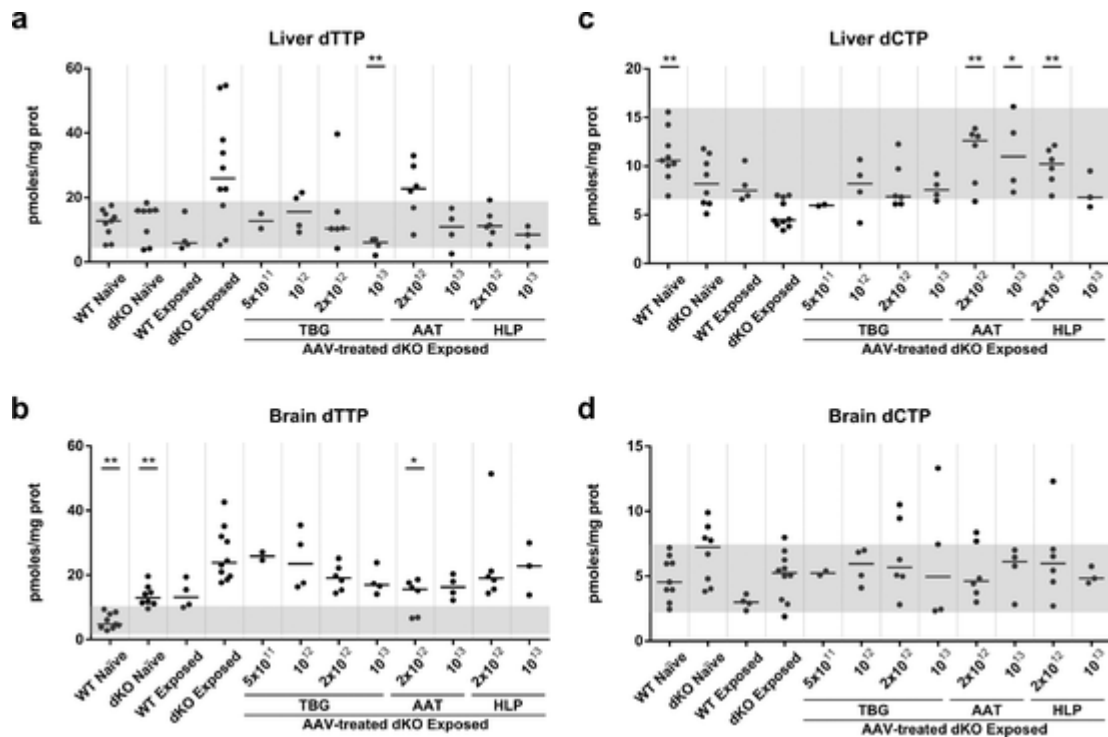


**Fig. 5.** Brain MRI analysis. (a) Coronal T2-weighted and T2 map images of 1-mm sections (region corresponding to slice 6 in Supp Figure S7) showing ventricular enlargement in dKO exposed mice (red arrows). (b) Ventricular volume in 80 to 84-weeks old WT ( $n = 9$ ) and dKO ( $n = 5$ ) naïve mice, non-treated WT ( $n = 5$ ) and dKO ( $n = 12$ ) exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAVs doses (TBG-treated mice with:  $5 \times 10^{11}$  vg/kg  $n = 2$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n = 3$ ,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 5$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 5$ ; AAT-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; HLP-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 3$ ). Ventricular volume was quantified in T2 maps as the sum of the ventricular volumes calculated in all sections analyzed in Supp Figure S6 (see materials and methods for calculations). Gray areas indicate the range of values in the naïve WT group. Asterisks indicate statistically significant differences ( $*p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed). Ventricular volume values above the mean plus 3 SD of all data were considered outliers and excluded from the analysis. Two outliers were identified in dKO exposed AAV-treated with TBG  $10^{12}$  vg/kg, and TBG  $2 \times 10^{12}$  vg/kg, one in each group.

### 3.6. AAV-TYMP treatment normalized the mitochondrial dNTP balance

In MNGIE, nucleoside overload leads to an unbalanced dNTP mitochondrial pool, resulting in mtDNA instability [4]. We quantified dNTP levels in mitochondrial extracts from liver and brain in 22-month-old mice (Fig 6). dTTP content was significantly increased in brain mitochondria of exposed dKO mice. The same trend was observed in liver mitochondria, but statistical significance was not reached, probably

owing to the wide dispersion of the values (liver dTTP range: 5.3–54.7 pmoles/mg protein). The dTTP expansion in liver was largely prevented in exposed dKO mice treated with AAVs, as most values of AAV treated mice returned to dTTP values with the naïve WT range, although only the group treated with AAV-TBG at  $10^{13}$  vg/kg reached statistical significance (Fig. 6a). AAV treatment also limited dTTP expansion in brain, but the effect was only partial as dNTP in AAV-treated animals did not reach WT levels (and reached statistical significance only in the group treated with AAV-AAT at  $2 \times 10^{12}$  vg/kg)



**Fig. 6.** Mitochondrial dNTPs. Mitochondrial thymidine triphosphate (dTTP) and deoxycytidine triphosphate (dCTP) content in liver (a and c) and brain (b and d) of WT ( $n = 9$ ) and dKO ( $n = 8$ ) naïve mice, non-treated WT ( $n = 4$ ) and dKO ( $n = 10$ ) exposed mice and dKO exposed mice treated with different AAVs doses (TBG-treated mice with:  $5 \times 10^{11}$  vg/kg  $n = 2$ ,  $10^{12}$  vg/kg  $n = 4$ ,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; AAT-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 4$ ; HLP-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg  $n = 6$  and  $10^{13}$  vg/kg  $n = 3$ ). Horizontal lines indicate the median for each group. Gray areas indicate the range of values in the naïve WT group. Asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed).

(Fig. 6b). The observations regarding mitochondrial dCTP levels in liver conversely mirrored those of dTTP; that is, exposed dKO showed dCTP depletion as compared with WT levels, which was largely prevented by AAV treatment, reaching statistical significance for all AAV-AAT treated groups, and for the group treated with AAV-HLP at  $2 \times 10^{12}$  vg/kg (Fig. 6c). No statistical differences were detected in mitochondrial dCTP levels in brain (Fig. 6d). As to the purine deoxynucleotides, mitochondrial dGTP levels were expanded in liver (an increase that was not prevented by AAV treatment), while dATP showed a tendency to be depleted in the same organ (statistically non-significant), but the effect was prevented in most AAV treated groups. In contrast, mitochondrial dATP and dGTP levels were barely affected or not affected at all in brain (Supplementary Fig. 8).

#### 4. Discussion

Over the last few years, gene therapy has been proposed to reduce the relevant risks associated with the currently available options to treat MNGIE (allogeneic stem cell transplantation and orthotopic liver transplantation) [11-13,15-18,34]. Since the first proof-of-concept preclinical studies demonstrating the feasibility of using lentiviral[22] and AAV vectors [23], several studies have shown that these strategies provide maintained effectiveness at long term in the preclinical model [19-21,24]. The main endpoint used to draw conclusions was the ability of the vectors to achieve genetic correction in target cells of the murine dKO model, thereby providing TP activity and normalization of systemic dThd and dUrd levels.

However, the dKO mouse is a limited model due to the absence of a clinically relevant phenotype, which consists of a lack of TP activity (except for some residual activity in tissues expressing *Upp2*), moderate dThd and dUrd systemic accumulation, and a modest mitochondrial dNTP imbalance. Any additional traits beyond the biochemical consequences of the absence of TP have only been glimpsed in very old ani-

mals and, even so, as elusive and barely detectable signs [5]. The model can be enhanced by providing the animals with dThd and dUrd in drinking water, which exacerbates the phenotype and highlights the importance of dThd and dUrd overload in the pathophysiology of MNGIE [25]. This enhanced model does not recapitulate the main clinical features of the disease (which manifest mainly as severe gastrointestinal dysmotility, myopathy, peripheral neuropathy and brain diffuse leukoencephalopathy). Specifically, the lack of gastrointestinal phenotype is an important limitation of this animal model, because gastrointestinal dysmotility is the most debilitating symptom in MNGIE patients [9]. However, it does show some new functional and radiological alterations (neuromotor dysfunction and ventricular alterations in brain) that are absent or much less prominent in the non-nucleoside exposed murine model. We used this enhanced preclinical model to expand on our previous studies demonstrating the feasibility and efficacy of AAV-based liver-targeted gene therapy for MNGIE [19,21,23].

Systemic dThd and dUrd levels in naïve dKO mice were 2- to 4-fold higher than levels in naïve WT mice, as was originally reported[5] and consistently observed here, which contrasts with the much more pronounced accumulations (more than 50-fold) observed in MNGIE patients [35,36]. In agreement with the study where the stressed model was established [25], we found that oral administration of dThd and dUrd to dKO mice exacerbates systemic accumulation of both dNs. Furthermore, the highest dThd and dUrd accumulations were seen in small intestine, likely because of the presence of ingested dNs, before or during intestinal absorption. In contrast, we found detectable dThd and dUrd levels in all tissues analyzed from naïve WT mice, and exposed dKO mice had dN levels only 20-fold above WT plasma values, and 10-fold above liver and brain WT values. These discrepancies likely result from the use of TP activity inhibitors during sample processing for dN determination, which prevented *in vitro* dN degradation in WT samples and reduced the differences between naïve WT and exposed dKO con-

centrations. As was expected, the excess of dThd and dUrd resulted in enhanced mitochondrial dNTP imbalances (dTTP increase and dCTP depletion) in the two tissues analyzed (liver and brain).

We found an unreported effect of dN exposure on mice: an increase in TP activity in liver, but not in skeletal muscle, small intestine, or brain. A similar effect (*TYMP* upregulation) has been reported in cultured human cells in response to dThd and nucleoside analogues [37]. Exposure to dN doubled liver TP activity in WT mice and, interestingly, also increased activity in dKO animals. Upregulation of *Tymp* or other genes encoding enzymes with TP activity (such as *Upp1* and *Upp2*) may account for this increase in WT mice. Additionally, dThd excess could be inhibiting the ubiquitin-mediated TP degradation as it has been recently reported in human differentiating reticulocyte cell cultures [38]. In contrast, *Tymp* and *Upp1* genes are molecularly inactivated in the dKO model [5,39]; therefore, dN-induced TP activity in these animals should be mediated by upregulation of another enzyme, likely UP2 (encoded by *Upp2*). In fact, naïve dKO mice have some detectable TP activity in liver that must be due to UP2.

All MNGIE patients present diffuse leukoencephalopathy on brain MRI, but this abnormality is barely detectable in naïve dKO mice, and is only seen when they are very old [4]. The first study of the nucleoside-exposed dKO model demonstrated that chronic exposure to dThd and dUrd led to increased brain MRI FLAIR intensity signal around the third and lateral ventricles [25]. In our study, we failed to detect MRI differences between naïve dKO and naïve WT mice, showing how elusive this feature is in the unexposed mouse model. Nonetheless, and in agreement with the previous report [25], dKO mice (but not WT mice) did develop the MRI phenotype under dN exposure, although we found enlarged ventricle volumes rather than the diffuse parenchymal leukoencephalopathy that is typically observed in MNGIE patients. Combined analysis of T2 maps and high-resolution T2-weighted images revealed that the periventricular signal hyperintensity corresponds to enlarged ventricular volume, with no fluid transfer to the surrounding white matter, in contrast to what is observed in other hydrocephalic models with severe ventricular enlargement [40]. Exposure to dNs also succeeded in the development of a motor function phenotype. At 25 weeks of age, exposed dKO mice showed a shorter time to fall in the rotarod test, which is indicative of motor coordination impairment in this model, in agreement with previous findings [25]. Furthermore, rotarod time to fall at 25 weeks of age inversely correlated with MRI ventricular volume assessed at 84 weeks of age, which concurs with previous studies associating hydrocephalus with motor function defects [41].

As was discussed above, most effects of dN exposure seen in our study are consistent with previously reported findings [25], but we failed to replicate some other important features. After careful histological analysis (Masson's trichrome staining), we found no abnormalities in small intestine of exposed mice, and no mtDNA depletion was detected in brain or in small intestine.

In previous preclinical studies, we used the TBG promoter in AAV gene therapy for MNGIE and proved that it is effective for driving hcTYMP expression [21,23]. The need to optimize therapeutic gene expression and minimize the vector dose to transfer therapy to MNGIE patients prompted us to explore new vector constructs [19]. The ApoE-AAT enhancer-promoter cassette has been used in several AAV-based preclinical and clinical studies [42-45]. The self-complementary genome configuration resulted in faster and stronger therapeutic gene expression in these studies, and it has also been successfully used in patients [46-48]. We found that use of the AAV-AAT vector to carry hcTYMP in the dKO model resulted in greater efficacy as compared to other hepatic promoters or a self-complementary configuration [19]. Now, taking advantage of the enhanced nucleoside-exposed animal model to expand the study, we found that AAV-AAT provides an effect beyond the previously reported biochemical normalization. AAV-AAT performed better than other liver-targeted vectors in restoring biochemical

homeostasis (nucleoside reduction, liver TP activity, dNTP normalization), and it also improved the brain MRI abnormalities manifested in the exposed mouse model.

Our attempts to determine the effect of different vectors on dN homeostasis revealed an unexpected limitation of the model. As mice received dNs in their drinking water ad libitum, the variability in dN levels seen over the day was likely determined by the last time the mouse drank water. To circumvent this confounding factor, we decided to determine PK parameters (peak concentration, AUC, and time to reach WT values) after a single gavage administration, instead of single dN values in one blood sample, as more reliable biochemical endpoints to study the effect of the vectors on dN homeostasis in the model. A vector dose-response was observed in most cases, and comparison between the three vectors showed that AAV-AAT was the most efficient to reduce plasma dN levels, which is consistent with their better comparative ability to provide TP activity to liver. As was expected, all vectors led to substantial dose-dependent TP activity in liver, and the analysis of TP activity/vector copy number ratios indicated that the AAT promoter was the most efficient. All these observations confirm and reinforce our previous results on the efficacy of different vectors [19].

Previously, we observed that treatment with AAV-TBG, AAV-HLP and AAV-AAT results in sporadic cases of increased TP activity in non-hepatic tissues [19], and this was confirmed here in an independent set of experiments. In our previous report, we found that this "illegitimate activity" seems not to be caused by ectopic expression, as transgene DNA or mRNA could not be consistently found in samples with TP activity. Hence, this activity might respond to exosomal export from liver [49]. In any case, this extra-hepatic effect was irrelevant in quantitative terms in both the previous and the current study. dNTP imbalances were ameliorated in liver as a consequence of the systemic dN reduction. The effect in brain, however, was only partial. The fact that liver, but not brain, is the target of the vectors tested here may account for the modest effect in brain. In addition, the anatomic complexity of the brain, constituted by many cell types distributed among different functional areas, may mask local effects, as our method for mitochondrial dNTP determination is performed on total brain mitochondria. Interestingly, dCTP depletion could not be detected in brain mitochondria, which correlates with the absence of mtDNA depletion in this organ, in agreement with previous experimental data showing that the cause of mtDNA depletion in MNGIE is limited availability of dCTP [4].

Of note, this is the first time that AAV-mediated gene therapy has shown efficacy on disease-related features in MNGIE beyond normalization of the biochemical imbalances. Nucleoside-exposed mice treated with AAV-HLP and AAV-AAT vectors recovered normal ventricular volumes on MRI, while this effect was only partial (in some mice) and not statistically significant with the AAV-TBG vector. When all mice were taken as a whole, ventricular volumes significantly correlated with dThd levels in brain, reinforcing the notion that normalization of the biochemical imbalances is directly related with improvements in this neurological trait. However, the results did not allow us to draw clear conclusions on the effect of therapy on motor function, as assessed with the rotarod test. Time to fall in the rotarod test was shorter in nucleoside-exposed dKO mice, which can be due to alterations in the central nervous system and/or the skeletal muscle. This reduction seemed to be prevented in most groups of AAV-treated mice. However, if this observation suggests a positive effect of the treatment, it is uncertain why was it not observed at the highest vector doses. The reasons for this apparent paradox remain to be explored.

The results of this study show that the AAV-AAT vector performed the best among those tested, efficiently providing TP activity to the liver and restoring dN and dNTP homeostasis. In addition, functional improvements on the phenotype beyond normalization of biochemical markers were proven for AAV-mediated MNGIE gene therapy in the nucleoside-exposed dKO mouse model. AAV transduction rates are lower

in humans than in mice [50,51]; therefore, using more potent promoters, within a reasonable range of potency, will be necessary to make AAV treatment possible in humans at feasible vector doses. This will have an impact on both biosafety and the cost of treatment, and contribute to facilitating implementation of this therapy in patients, which constitutes a significant advance towards the treatment of this devastating disorder with a much less invasive therapy than those currently available.

### Contributors

F. Vila-Julà, J. Torres-Torronteras and R. Martí designed the study and wrote the manuscript; F. Vila-Julà, R. Cabrera-Pérez, Y. Cámara, M. Molina-Berenguer, S. Lope-Piedrafita, and J. Torres-Torronteras performed the experiments and collected and analysed the data; F. Vila-Julà, S. Lope-Piedrafita, J. Torres-Torronteras and R. Martí participated in data interpretation; M. Hirano generated and provided the mouse model; F. Mingozzi produced and provided the AAV-AAT vector; all the participating authors contributed to the critical revision of the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

### Declaration of Competing Interests

RM, FV and MM report grants from the *Instituto de Salud Carlos III* during the conduct of the study; JT reports grants from Departament de Salut, Generalitat de Catalunya (PERIS program), during the conduct of the study; RM, MH, JT and YC report grants and non-financial support from Modis Therapeutics, personal fees and other from Modis Therapeutics, outside the submitted work; in addition, RM and MH have a patent “Deoxynucleoside therapy for diseases caused by unbalanced nucleotide pools including mitochondrial DNA depletion syndromes” (PCT/US16/038110) with royalties paid to Modis Therapeutics; MH reports grants and other support from Entrada Therapeutics, grants from Muscular Dystrophy Association and grants from NIH, outside the submitted work; FM is an employee of Spark Therapeutics; SL reports that the Nuclear Magnetic Resonance facility where she works charged the VHIR a fee for the MRI services; and RM, YC, JT and RC have a patent “Treatment of mitochondrial diseases” (PCT/EP2016/062636) with royalties paid to Modis Therapeutics.

### Acknowledgments

JT and FV were funded by fellowships granted by the Generalitat de Catalunya (PERIS program, SLT002/16/00370 to JT and FI-AGAUR program 2018FI\_B\_01115 to FV). This work was funded in part by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (Grants PI15/00465, PMP15/00025 and PI18/01574 to R.M., co-funded with E.R.D.F.). The disclosed funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Data sharing statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors, RM and JT, upon reasonable request.

### Supplementary materials

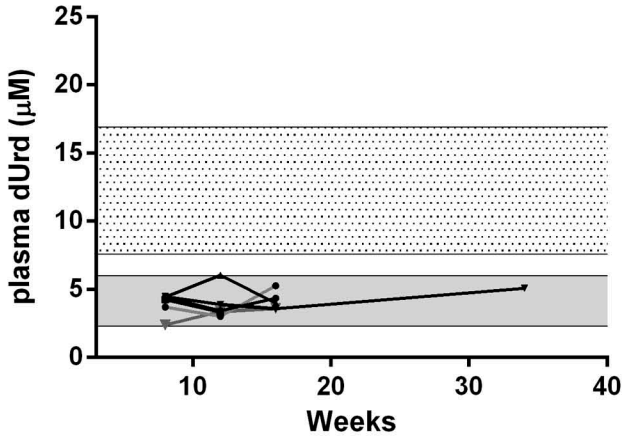
Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ebiom.2020.103133.

### References

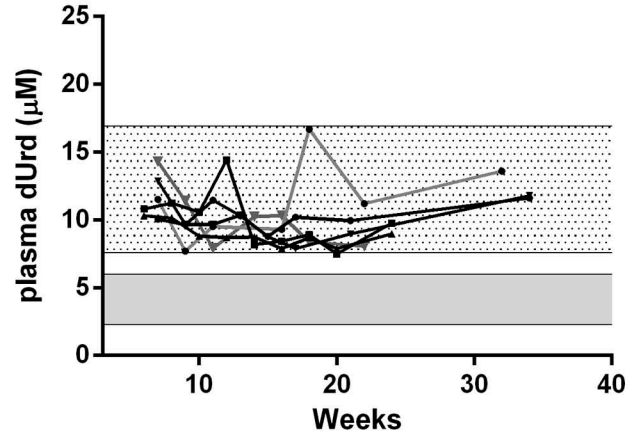
- [1] I. Nishino, A. Spinazzola, M Hirano Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283(5402):689–692.
- [2] R. Martí, Y. Nishigaki, M Hirano Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303(1):14–18.
- [3] A. Spinazzola, R. Martí, I. Nishino, A.L. Andreu, A. Naini, S. Tadesse, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 2002;277(6):4128–4133.
- [4] E. Gonzalez-Vioque, J. Torres-Torronteras, A.L. Andreu, R Martí Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* 2011;7(3):e1002035.
- [5] L.C. Lopez, H.O. Akman, A. Garcia-Cazorla, B. Dorado, R. Martí, I. Nishino, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18(4):714–722.
- [6] Y. Nishigaki, R. Martí, W.C. Copeland, M Hirano Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003;111(12):1913–1921.
- [7] Y. Nishigaki, R. Martí, M Hirano ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 2004;13(1):91–101.
- [8] G. Pontarin, P. Ferraro, M.L. Valentino, M. Hirano, P. Reichard, V Bianchi Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281(32):22720–22728.
- [9] C. Garone, S. Tadesse, M Hirano Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2011;134(Pt 11):3326–3332.
- [10] R. Cabrera-Pérez, J. Torres-Torronteras, F. Vila-Julà, F.J. Ortega, Y. Cámara, J. Barquinero, et al. Prospective therapeutic approaches in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Expert Opin Orphan Drugs* 2015;3(10):1167–1182.
- [11] J. Halter, W.M. Schubach, C. Casali, R. Elhasid, K. Fay, S. Hammans, et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transpl* 2010;46(3):330–337.
- [12] M. Hirano, R. Martí, C. Casali, S. Tadesse, T. Uldrick, B. Fine, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67(8):1458–1460.
- [13] J.P. Halter, W. Michael, M. Schubach, H. Mandel, C. Casali, K. Orchard, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2015;138(Pt 10):2847–2858.
- [14] E. Boschetti, R. D'Alessandro, F. Bianco, V. Carelli, G. Cenacchi, A.D. Pinna, et al. Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS ONE* 2014;9(5):e96692.
- [15] R. D'Angelo, E. Boschetti, G. Amore, R. Costa, A. Pugliese, L. Caporali, et al. Liver transplantation in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical long-term follow-up and pathogenic implications. *J Neurol* 2020.
- [16] R. D'Angelo, R. Rinaldi, L. Pironi, M.T. Dotti, A.D. Pinna, E. Boschetti, et al. Liver transplant reverses biochemical imbalance in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Mitochondrion* 2017;34:101–102.
- [17] R. De Giorgio, L. Pironi, R. Rinaldi, E. Boschetti, L. Caporali, M. Capristo, et al. Liver transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Ann Neurol* 2016;80(3):448–455.
- [18] K. Kripps, W. Nakayuenyongsuk, B.J. Shayota, W. Berquist, N. Gomez-Ospina, C.O. Esquivel, et al. Successful liver transplantation in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Mol Genet Metab* 2020;130(1):58–64.
- [19] R. Cabrera-Pérez, F. Vila-Julà, M. Hirano, F. Mingozzi, J. Torres-Torronteras, R Martí Alpha-1-antitrypsin promoter improves the efficacy of an adeno-associated virus vector for the treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2019;30(8):985–998.
- [20] J. Torres-Torronteras, R. Cabrera-Pérez, I. Barba, C. Costa, N. de Luna, A.L. Andreu, et al. Long-term restoration of thymidine phosphorylase function and nucleoside homeostasis using hematopoietic gene therapy in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2016;27(9):656–667.
- [21] J. Torres-Torronteras, R. Cabrera-Pérez, F. Vila-Julà, C. Viscomi, Y. Cámara, M. Hirano, et al. Long-term sustained effect of liver-targeted adeno-associated virus gene therapy for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2018;29(6):708–718.
- [22] J. Torres-Torronteras, A. Gomez, H. Eixarch, L. Palenzuela, G. Pizzorno, M. Hirano, et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* 2011;18(8):795–806.
- [23] J. Torres-Torronteras, C. Viscomi, R. Cabrera-Perez, Y. Camara, I. Di Meo, J. Barquinero, et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther* 2014;22(5):901–907.
- [24] R. Yadak, R. Cabrera-Pérez, J. Torres-Torronteras, M. Bugiani, J.C. Haack, M.W. Huston, et al. Preclinical efficacy and safety evaluation of hematopoietic stem cell gene therapy in a mouse model of MNGIE. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;8:152–165.
- [25] B. Garcia-Diaz, C. Garone, E. Barca, H. Mojahed, P. Gutierrez, G. Pizzorno, et al. Deoxynucleoside stress exacerbates the phenotype of a mouse model of

- mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy. *Brain* 2014;137(Pt 5):1337–1349.
- [26] J. McIntosh, P.J. Lenting, C. Rosales, D. Lee, S. Rabbanian, D. Raj, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* 2013;121(17):3335–3344.
- [27] A.M. Davidoff, C.Y. Ng, J. Zhou, Y. Spence, A.C. Nathwani Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 2003;102(2):480–488.
- [28] M.M. Bradford A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- [29] R. Martí, L.C. López, M. Hirano Assessment of thymidine phosphorylase function: measurement of plasma thymidine (and deoxyuridine) and thymidine phosphorylase activity. *Methods Mol Biol* (Clifton, NJ) 2012;837:121–133.
- [30] M.J. Pérez-Pérez, E.M. Priego, A.I. Hernández, M.J. Camarasa, J. Balzarini, S. Liekens Thymidine phosphorylase inhibitors: recent developments and potential therapeutic applications. *Mini Rev Med Chem* 2005;5(12):1113–1123.
- [31] P.A. Sherman, J.A. Fyfe Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem* 1989;180(2):222–226.
- [32] C. Blázquez-Bermejo, D. Molina-Granada, F. Vila-Julà, D. Jiménez-Heis, X. Zhou, J. Torres-Torronteras, et al. Age-related metabolic changes limit efficacy of deoxynucleoside-based therapy in thymidine kinase 2-deficient mice. *EBioMedicine* 2019;46:342–355.
- [33] C. Moolenbeek, E.J. Ruitenberg The “Swiss roll”: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab. Anim.* 1981;15(1):57–59.
- [34] M. Hirano, C. Casali, S. Tadesse, M. Stanzani, D. Savage Sustained biochemical and clinical improvements two years postallogeneic stem cell transplantation in a patient with MNGIE. *Neurology* 2008;70:A406–A4A7.
- [35] R. Martí, A. Spinazzola, S. Tadesse, I. Nishino, Y. Nishigaki, M. Hirano Definitive diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays. *Clin Chem* 2004;50(1):120–124.
- [36] M.L. Valentino, R. Martí, S. Tadesse, L.C. Lopez, J.L. Manes, J. Lyzak, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* 2007;581(18):3410–3414.
- [37] K. Tsuneyoshi, M. Haraguchi, Z. Hongye, T. Gotanda, T. Tachiwada, T. Sumizawa, et al. Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity. *Cancer Lett* 2006;244(2):239–246.
- [38] M. Meinders, D. Shoemark, J.G.G. Dobbe, G.J. Streekstra, J. Frayne, A.M. Toye Expression and retention of thymidine phosphorylase in cultured reticulocytes as a novel treatment for MNGIE. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020;17:822–830.
- [39] D. Cao, J.J. Leffert, J. McCabe, B. Kim, G. Pizzorno Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. *J Biol Chem* 2005;280(22):21169–21175.
- [40] J.G. Mandell, T. Neuberger, C.S. Drapaca, A.G. Webb, S.J. Schiff The dynamics of brain and cerebrospinal fluid growth in normal versus hydrocephalic mice. *J Neurosurg Pediatr* 2010;6(1):1–10.
- [41] M.J. Lee, C.P. Chang, Y.H. Lee, Y.C. Wu, H.W. Tseng, Y.Y. Tung, et al. Longitudinal evaluation of an N-ethyl-N-nitrosourea-created murine model with normal pressure hydrocephalus. *PLoS ONE* 2009;4(11):e7868.
- [42] L.A. George, S.K. Sullivan, A. Giermasz, J.E.J. Rasko, B.J. Samelson-Jones, J. Ducore, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N Engl J Med* 2017;377(23):2215–2227.
- [43] C.S. Manno, G.F. Pierce, V.R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J.J. Rasko, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006;12(3):342–347.
- [44] C.H. Miao, K. Ohashi, G.A. Patijn, L. Meuse, X. Ye, A.R. Thompson, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther* 2000;1(6):522–532.
- [45] S. Nayak, R.W. Herzog Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 2010;17(3):295–304.
- [46] A.C. Nathwani, J.T. Gray, C.Y. Ng, J. Zhou, Y. Spence, S.N. Waddington, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 2006;107(7):2653–2661.
- [47] A.C. Nathwani, U.M. Reiss, E.G. Tuddenham, C. Rosales, P. Chowdhary, J. McIntosh, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371(21):1994–2004.
- [48] Z. Wang, H.I. Ma, J. Li, L. Sun, J. Zhang, X. Xiao Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2003;10(26):2105–2111.
- [49] R.J. Simpson, H. Kalra, S. Mathivanan ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 2012;1.
- [50] L. Lisowski, A.P. Dane, K. Chu, Y. Zhang, S.C. Cunningham, E.M. Wilson, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* 2014;506(7488):382–386.
- [51] K. Vercauteren, B.E. Hoffman, I. Zolotukhin, G.D. Keeler, J.W. Xiao, E. Basner-Tschakarjan, et al. Superior in vivo transduction of human hepatocytes using engineered AAV3 capsid. *Mol Ther* 2016;24(6):1042–1049.

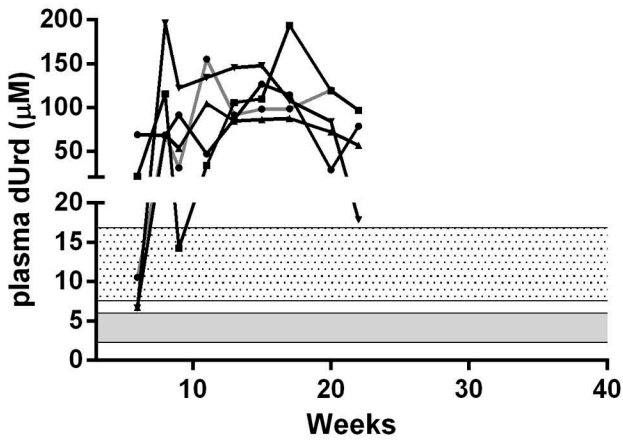
**WT naïve**



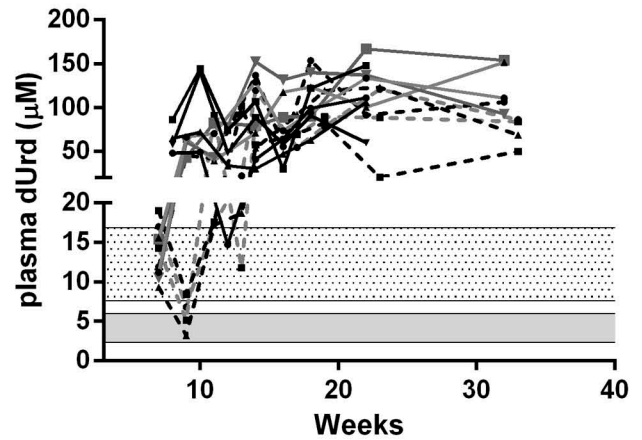
**dKO naïve**



**WT exposed**

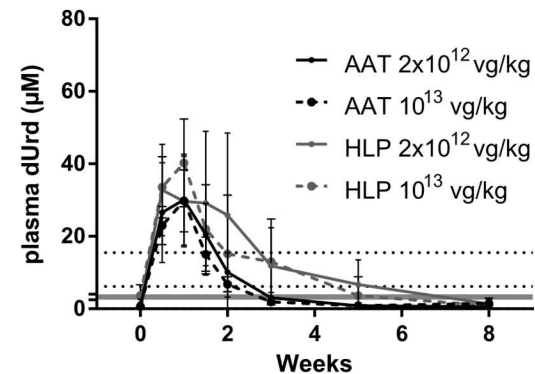
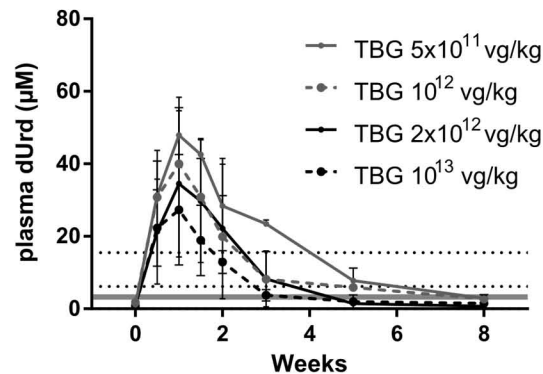
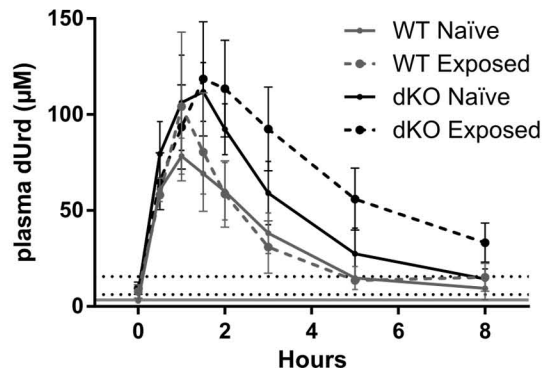
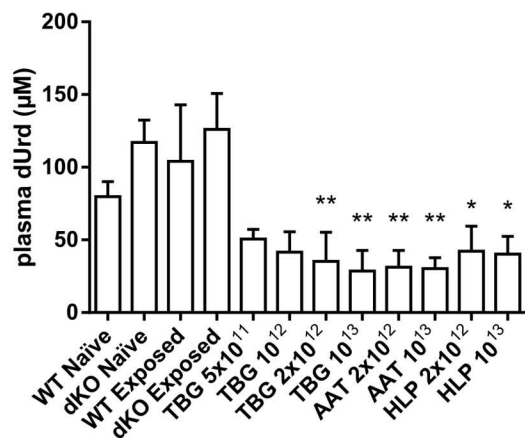
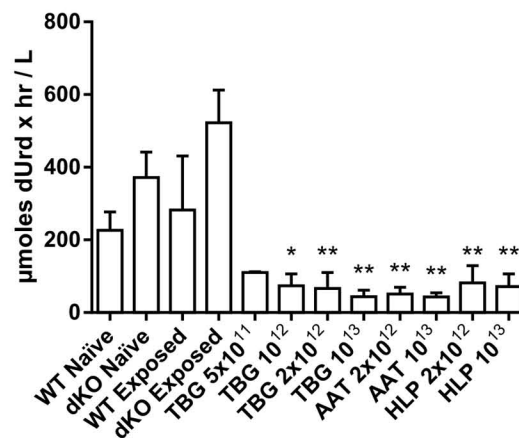
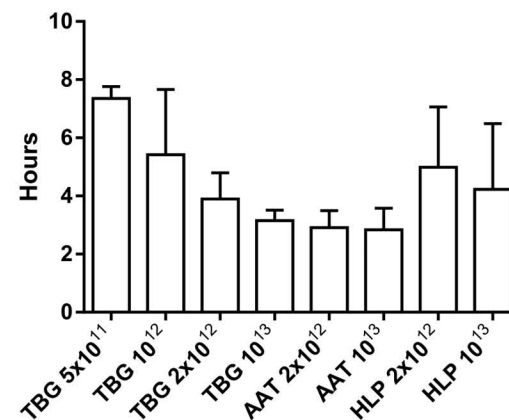


**dKO exposed**



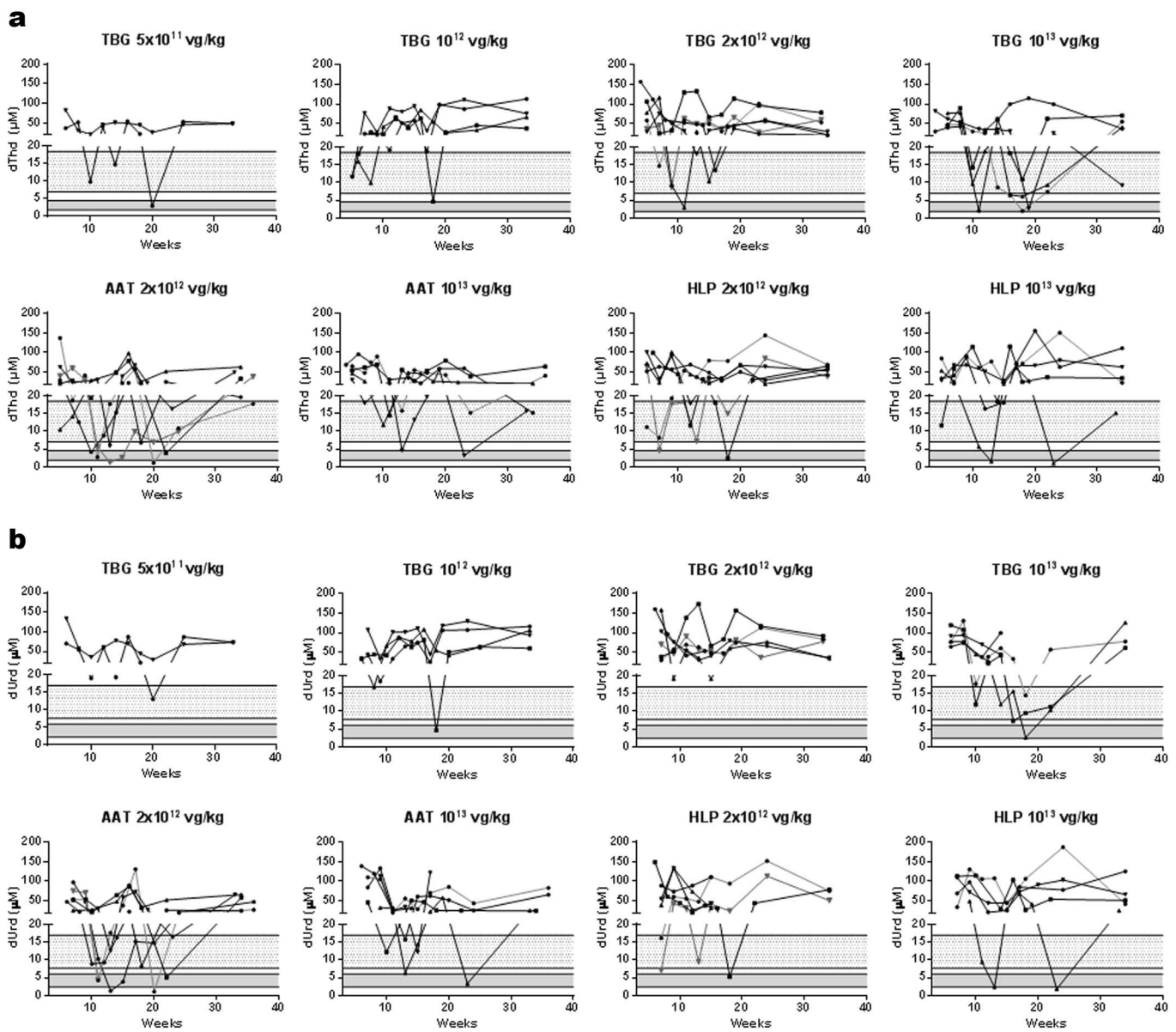
**Supplementary Figure 1.**

Plasma dUrd concentration in WT and dKO mice exposed to dThd and dUrd supplementation in drinking water from weaning (exposed group), or without exposure (naïve group). Monitored range encompasses from 5 to 34 weeks of age. Each symbol and line represents one single mouse. Grey dotted and shadowed areas indicate the concentration range in naïve dKO and WT groups, respectively.

**a****b****Plasma dUrd peak****c****AUC****d****Time to reach WT dUrd concentration****Supplementary Figure 2.**

a) Plasma dUrd concentrations before (0 hours) and after a single administration of dThd and dUrd by oral gavage (166 mg/kg each) in naïve and exposed WT mice, naïve and exposed dKO mice, and exposed dKO mice previously treated with different doses of AAV-TBG, AAV-AAT and AAV-HLP vectors. Mice were 35 to 45 week-old at the time of the experiment. Each point represents mean±range. White and grey areas between dotted lines indicate the concentration range in naïve dKO and WT groups at time zero, respectively. b, c and d), PK results (mean+SD) obtained from experiments depicted at (a). Sample sizes: naïve WT, n=8; naïve dKO, n=6; exposed WT, n=5; exposed dKO, n=7; TBG-treated mice with:  $5 \times 10^{11}$  vg/kg n=2,  $10^{12}$  vg/kg n=4,  $2 \times 10^{12}$  vg/kg n=5 and  $10^{13}$  vg/kg n=5; AAT-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg n=6 and  $10^{13}$  vg/kg n=5; HLP-treated mice with:  $2 \times 10^{12}$  vg/kg n=6 and  $10^{13}$  vg/kg n=4. Asterisks indicate statistically significant differences (\*p<0.05, \*\*p<0.01; panels b and c, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed; panel d, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with each other). AUC, area under the curve.

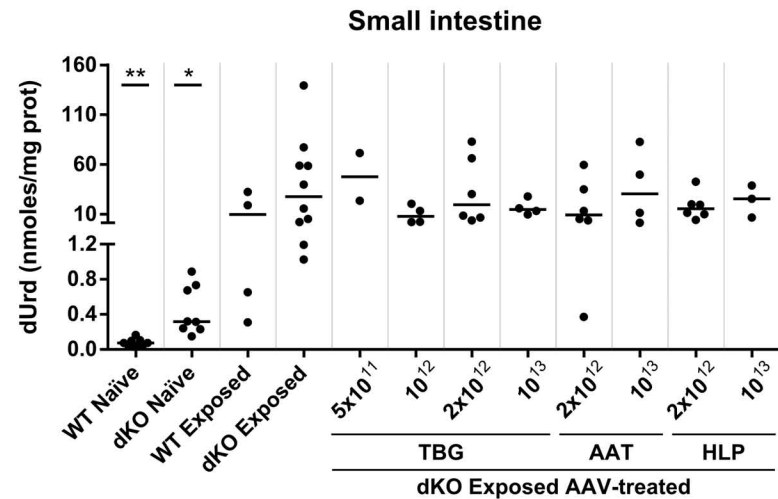
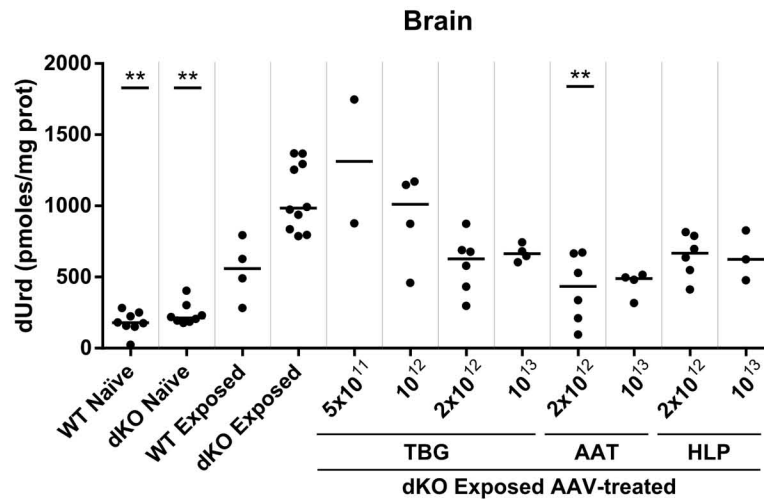
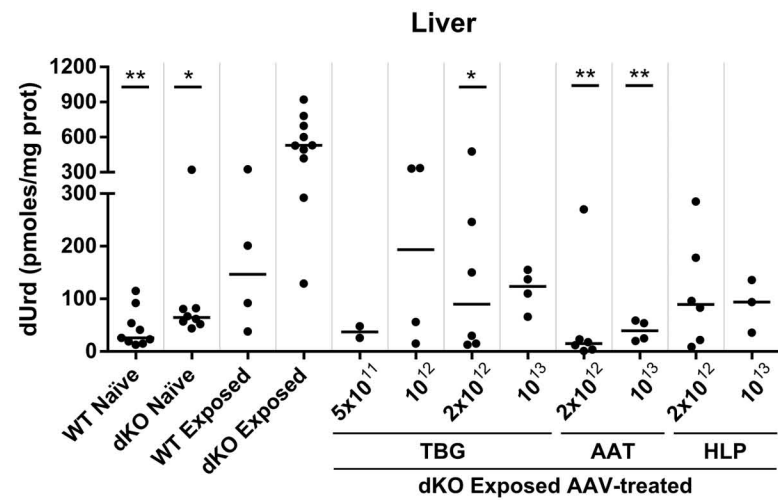
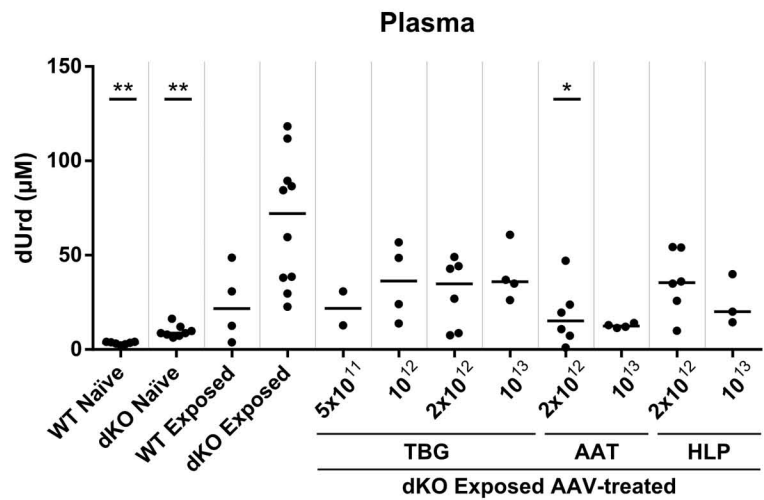




### Supplementary Figure 3.

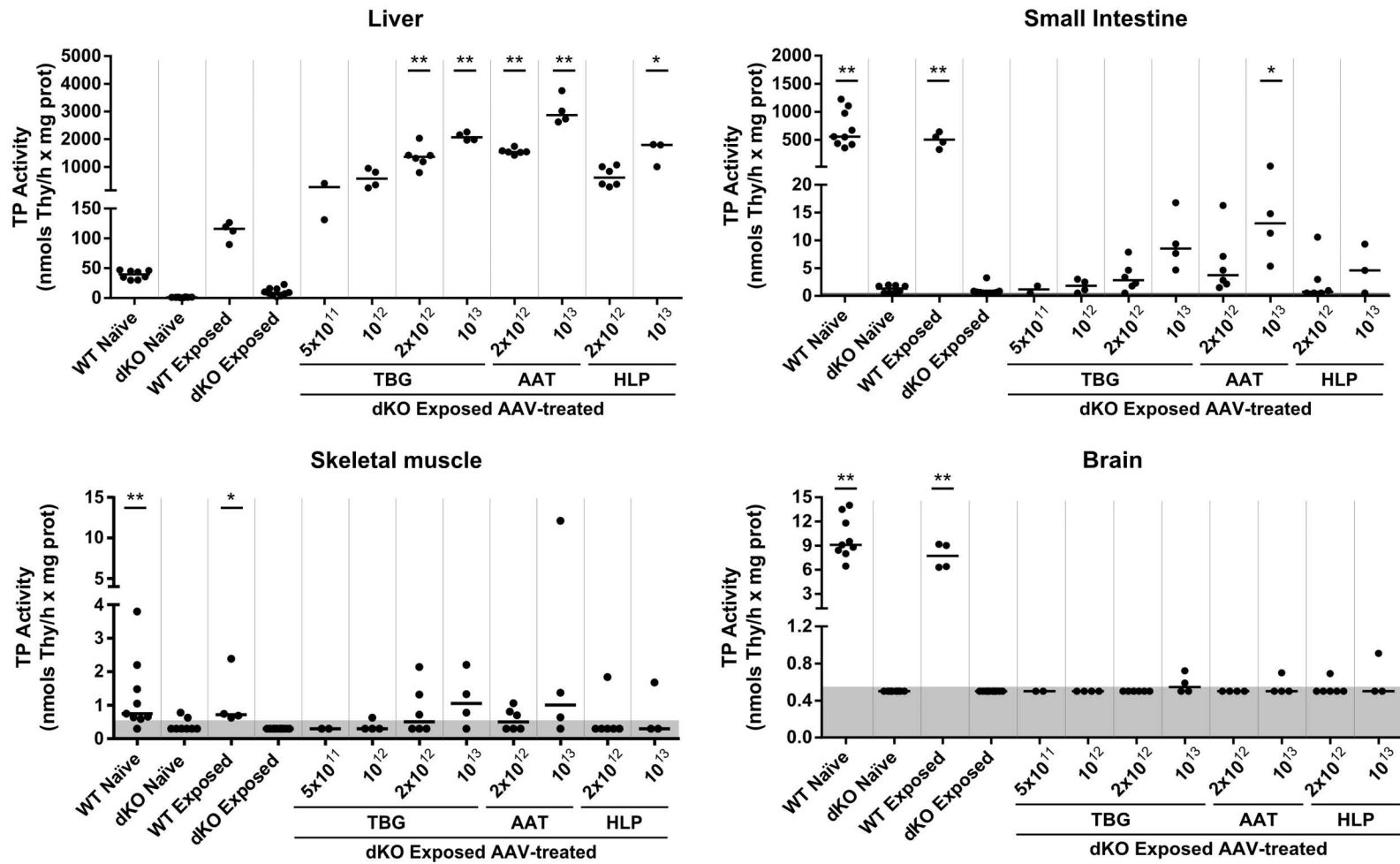
Plasma dThd (a) and dUrd (b) concentration monitoring in dKO exposed mice treated with different AAVs doses. Monitored range encompasses from 5 to 34 weeks of age. Each symbol and line represents one single mouse. Grey dotted and shadowed areas indicate the concentration range in untreated naïve dKO and WT groups, respectively.





#### Supplementary Figure 4.

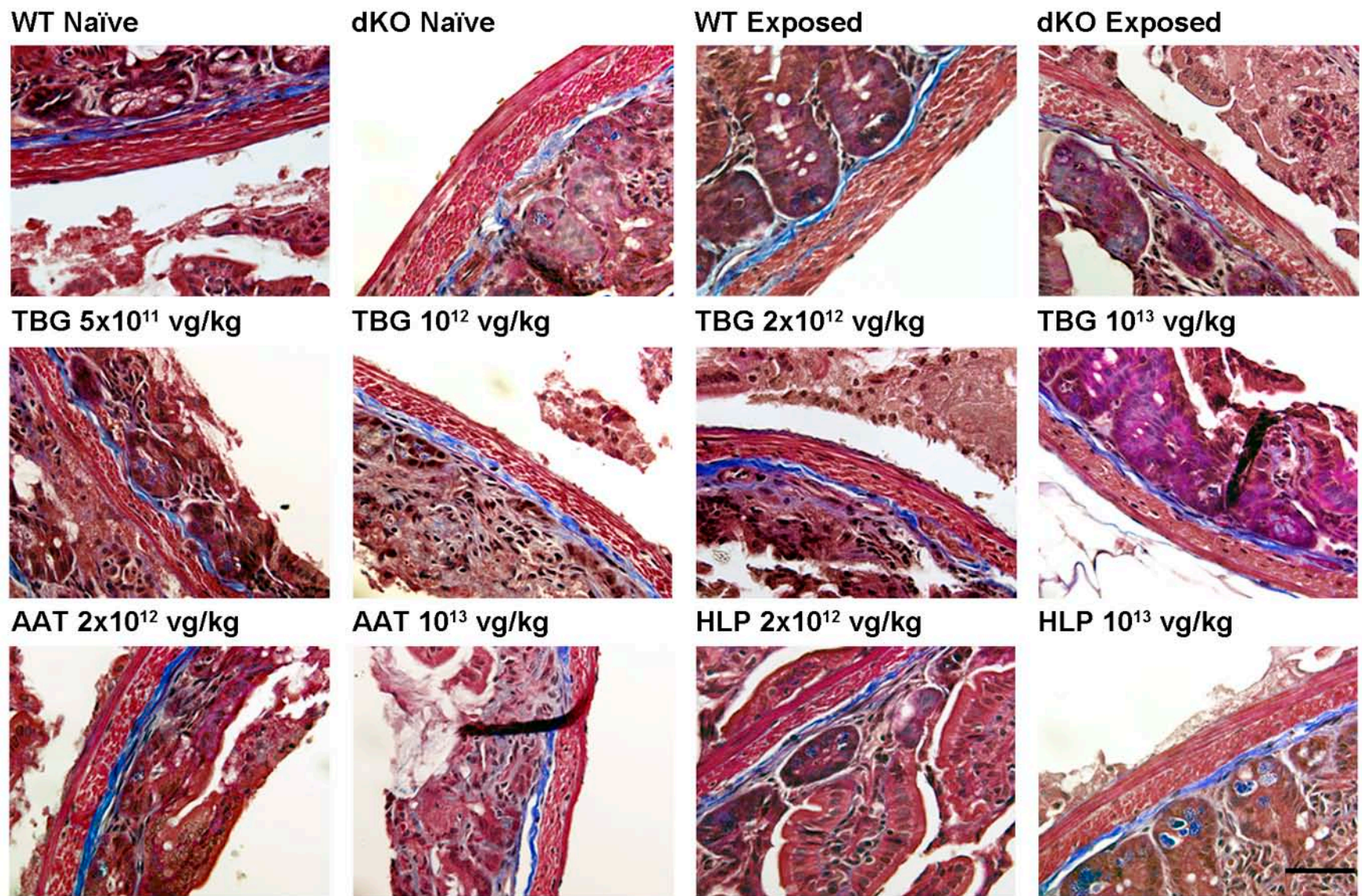
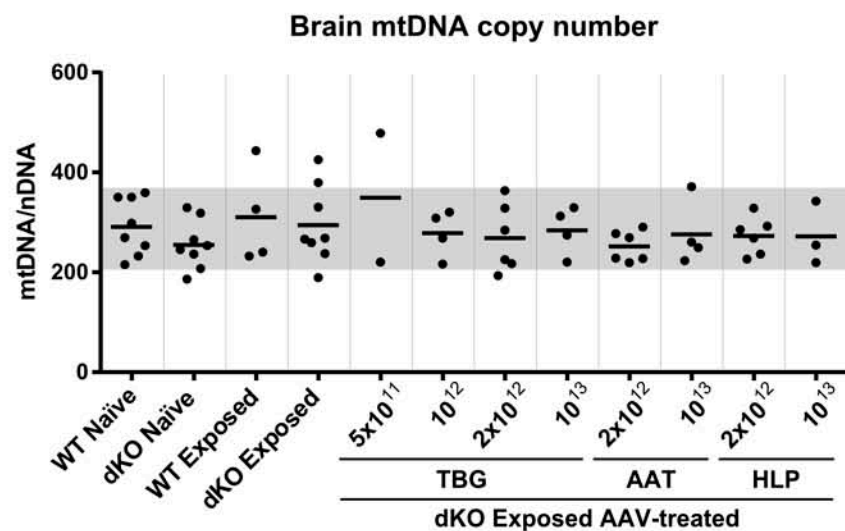
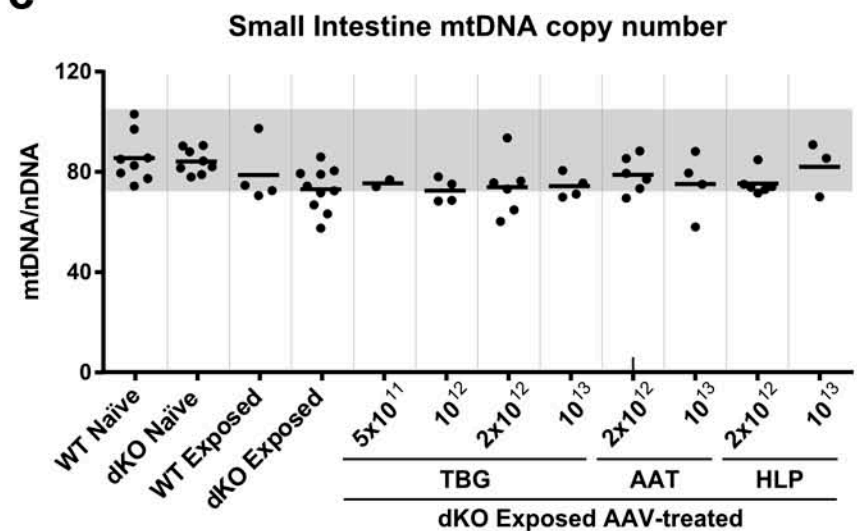
Effect of AAV treatment on dUrd levels in 22-month-old mice. Plasma, liver, brain and small intestine dUrd concentrations in WT (n=7-9) and dKO (n=8) naïve mice, WT (n=4) and dKO (n=10) exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAV doses (TBG-treated mice with 5x10<sup>11</sup> vg/kg n=2, 10<sup>12</sup> vg/kg n=4, 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=4; AAT-treated mice with 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=4; HLP-treated mice with 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=3). Horizontal lines indicate the median concentration in each group. Asterisks indicate statistically significant differences (\*p<0.05, \*\*p<0.01; Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed).



### Supplementary Figure 5.

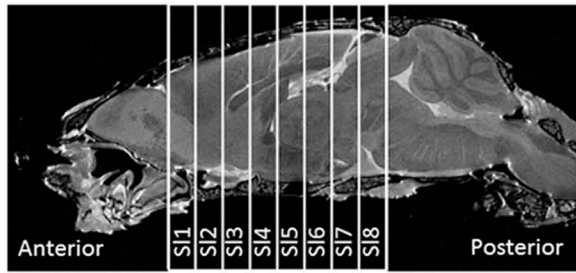
TP activity in liver, small intestine, skeletal muscle and brain of WT (n=8) and dKO (n=8) naïve mice, WT (n=4) and dKO (n=10) exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAVs doses (TBG-treated mice with 5x10<sup>11</sup> vg/kg n=2, 10<sup>12</sup> vg/kg n=4, 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=4; AAT-treated mice with 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=4; HLP-treated mice with 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=3). Horizontal lines indicate the median concentration in each group. For statistical purposes, values below the lower limit of quantification (grey shadowed area) were considered as zero. Asterisks indicate statistically significant differences (\*p<0.05, \*\*p<0.01; Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed).



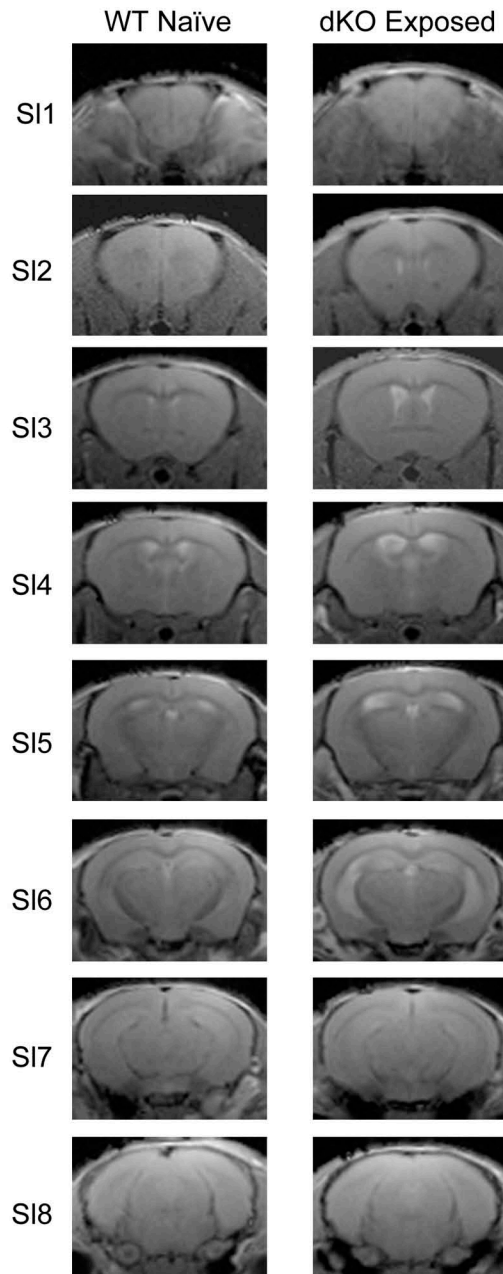
**a****b****c****Supplementary Figure 6.**

a) Masson trichrome staining of small intestine sections (3 μm, jejunum) of 22-month-old WT and dKO naïve mice, WT and dKO exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAVs doses. For enhanced visualization of collagen (blue stained) and surrounding smooth muscle cells (red), captured images were opened in TIFF format with the Adobe Photoshop software (Adobe Photoshop CS5 extended v.12.0, San Jose, CA, USA) and tone- and saturation-adjusted. Scale bar = 40 μm. b) and c) mtDNA copy number in brain and small intestine measured by qPCR. Grey areas indicate the range of values in the naïve WT group. No statistical differences found (Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's

**a**



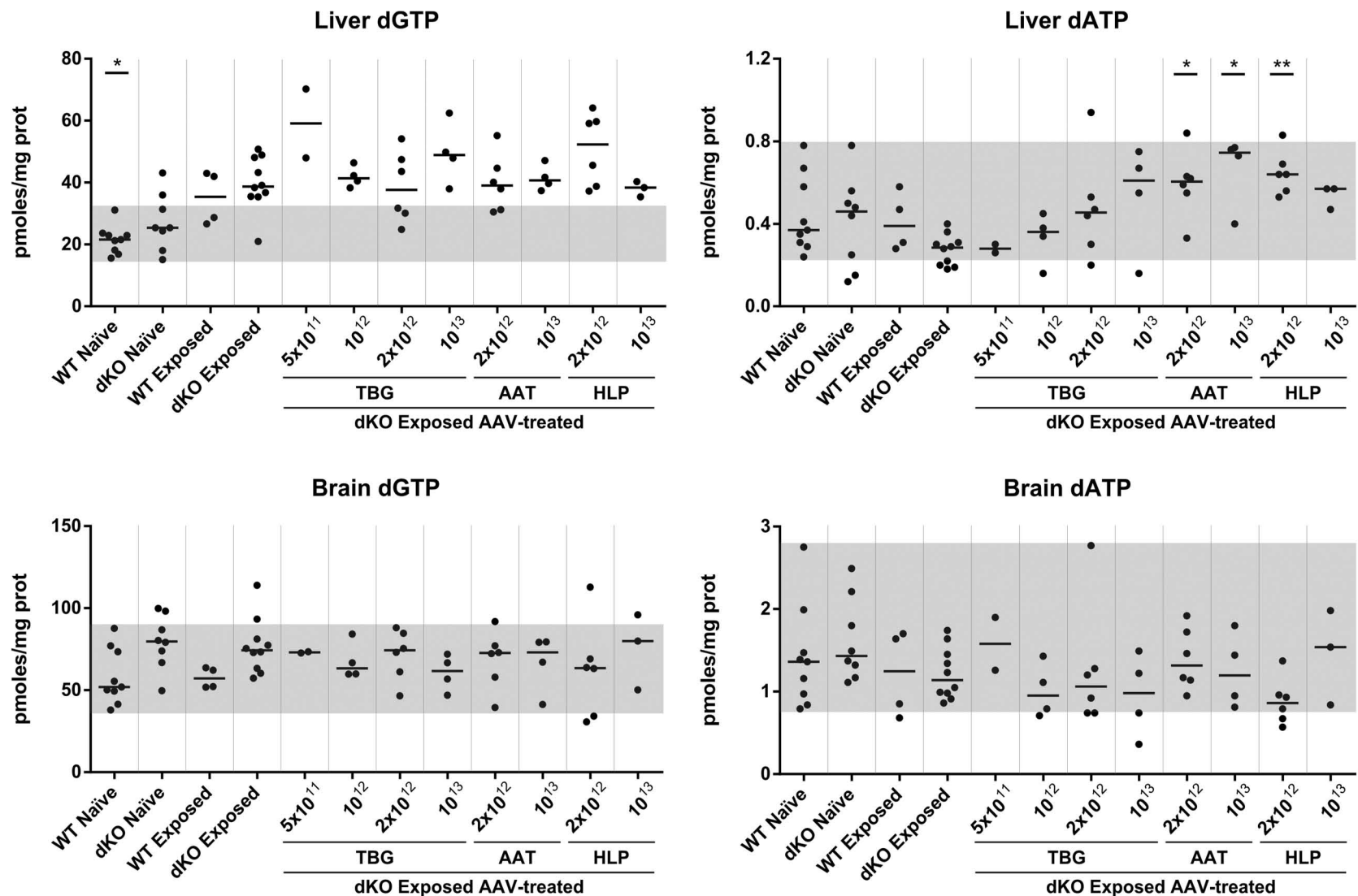
**b**



**Supplementary Figure 7.**

a) T2-weighted sagittal images of the brain plane showing the location of the coronal slices analyzed for ventricular volume quantification. b) T2-weighted images with 1-mm thick coronal sections showing slices analyzed for brain ventricular volume quantification in WT mice and dKO exposed mice.





**Supplementary Figure 8.**

Mitochondrial deoxyguanosine triphosphate (dGTP) and deoxyadenosine triphosphate (dATP) content in liver and brain of untreated WT (n=9) and dKO (n=8) naïve mice, untreated WT (n=4) and dKO (n=10) exposed mice, and dKO exposed mice treated with different AAVs doses (TBG-treated mice with 5x10<sup>11</sup> vg/kg n=2, 10<sup>12</sup> vg/kg n=4, 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=4; AAT-treated mice with 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=4; HLP-treated mice with 2x10<sup>12</sup> vg/kg n=6 and 10<sup>13</sup> vg/kg n=3). Horizontal lines indicate the median in each group. Grey areas indicate the range of values in the naïve WT group. Asterisks indicate statistical significance level (\*p<0.05, \*\*p<0.01; Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, all groups compared with dKO exposed).

# **11. ANNEX III - ALTRES PUBLICACIONS**

---



**PUBLICACIÓ:** PROSPECTIVE THERAPEUTIC APPROACHES IN MITOCHONDRIAL NEUROGASTROINTESTINAL ENCEPHALOMYOPATHY (MNGIE)

**AUTORS:** Raquel Cabrera-Pérez, BSc; Javier Torres-Torronteras, PhD; Ferran Vila-Julià, BSc, Francisco J Ortega, PhD; Yolanda Cámara, PhD; Jordi Barquinero, MD PhD; Ramon Martí, PhD

**DOI:** <https://doi.org/10.1517/21678707.2015.1090307>

**ABSTRACT:**

**Introduction:** Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is caused by mutations in TYMP, which encodes thymidine phosphorylase (TP). TP dysfunction leads to systemic overload of thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd), and altered mitochondrial deoxyribonucleotide homeostasis, which interferes with mitochondrial DNA replication and results in mitochondrial dysfunction. In MNGIE, the clinical phenotype is the consequence of an accumulation of noxious metabolites.

**Areas covered:** Knowledge gained about the pathomechanisms involved in MNGIE has allowed the design of plausible treatments aimed to clear the systemic dThd and dUrd overload. This article describes these strategies, from the first attempts to treat the disease through dialysis, to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), which has been the most successful treatment in the long term to date. This option, however, is associated with a high risk of severe adverse effects so safer alternatives with long-term efficacy are required such as gene therapy.

**Expert opinion:** The generally poor health of MNGIE patients at the time of treatment aggravates the risks associated with therapies like allo-HSCT. Recently, gene therapy has emerged as a feasible alternative, based on promising preclinical results. To this end, clinical trials should be carefully designed and carried out to investigate the safety and efficacy of this option.





# Long-Term Sustained Effect of Liver-Targeted Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy

Javier Torres-Torronteras,<sup>1,2</sup> Raquel Cabrera-Pérez,<sup>1,2</sup> Ferran Vila-Julià,<sup>1,2</sup> Carlo Viscomi,<sup>3</sup> Yolanda Cámara,<sup>1,2</sup> Michio Hirano,<sup>4</sup> Massimo Zeviani,<sup>3</sup> and Ramon Martí<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>MRC-Mitochondrial Biology Unit, MRC MBU, Wellcome Trust/MRC Building, Hills Road, Cambridge, United Kingdom; <sup>4</sup>H. Houston Merritt Center, Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, New York.

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is caused by mutations in *TYMP*, the gene encoding the enzyme thymidine phosphorylase (TP). TP dysfunction results in systemic accumulation of the noxious TP substrates thymidine and deoxyuridine. Gene therapy using either a lentiviral vector or adeno-associated vector (AAV) has proven to be a feasible strategy, as both vectors restore biochemical homeostasis in a murine model of the disease. This study shows that the effect of an AAV containing the *TYMP* coding sequence transcriptionally targeted to the liver persists long term in mice. Although the vector copy number was diluted and AAV-mediated liver TP activity eventually reduced or lost after 21 months at the lowest vector doses, the effect was sustained (with a negligible decrease in TP activity) and fully effective on nucleoside homeostasis for at least 21 months at a dose of  $2 \times 10^{12}$  vg/kg. Macroscopic visual inspection of the animals' organs at completion of the study showed no adverse effects associated with the treatment. These results further support the feasibility of gene therapy for MNGIE.

**Keywords:** AAV, liver/metabolic, MNGIE, thymidine phosphorylase, mitochondria

## INTRODUCTION

MITOCHONDRIAL NEUROGASTROINTESTINAL encephalomyopathy (MNGIE) is a mitochondrial disorder caused by autosomal recessive mutations in the nuclear gene *TYMP*, which encodes the cytosolic enzyme thymidine phosphorylase (TP).<sup>1–3</sup> MNGIE patients lack TP activity, and this deficit leads to systemic accumulation of TP substrates, the nucleosides thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd), which are precursors of the salvage pathway of deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), used for DNA synthesis. This expanded nucleoside concentration changes the mitochondrial dNTP pool and interferes with proper mitochondrial DNA (mtDNA) replication. As a result of the dNTP imbalance, MNGIE patients develop mtDNA depletion, multiple deletions, and point mutations

in certain tissues, which leads to mitochondrial dysfunction<sup>4,5</sup> (see Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)). MNGIE is a fatal disease, clinically characterized by gastrointestinal dysmotility, progressive external ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, diffuse leukoencephalopathy on brain magnetic resonance imaging, and mitochondrial dysfunction. The average age of disease onset is 18 years, but most patients experience their first symptoms in childhood. The condition progressively degenerates until death ensues, usually due to the gastrointestinal complications, at a mean age of 37 years.<sup>6</sup>

All the hitherto proposed therapeutic approaches for MNGIE have been focused on reducing dThd and dUrd concentrations to normal levels. The systemic

\*Correspondence: Dr. Ramon Martí, Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Pg Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Catalonia, Spain. E-mail: [ramon.marti@vhir.org](mailto:ramon.marti@vhir.org)

overload of these two compounds is the actual biochemical cause of the disease. The noxious effect of dThd excess on mtDNA replication has been demonstrated in different *in vitro* and *in vivo* models,<sup>7–10</sup> and therefore these constitute good biomarkers to predict the evolution of the disease. Only treatments that provide a permanent biochemical correction result in clinical improvement. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (alloHSCt) is the most widely used therapy for MNGIE, as it has proven to be effective in several patients; reduction of dThd and dUrd levels was associated with clinical stabilization or improvement in MNGIE patients treated with alloHSCt.<sup>11–13</sup> In two recent reports, orthotopic liver transplantation was also successfully used to treat MNGIE.<sup>14,15</sup> The rationale for these strategies is that both hematopoietic and liver tissue show high TP activity in humans. Therefore, engrafted donor tissue clears the dThd and dUrd excess in recipients. However, both of these options are invasive therapies and require compatible donors, and, in the case of alloHSCt, the procedure is associated with high mortality and morbidity rates in MNGIE patients.<sup>12</sup>

Previously, it was proposed that gene therapy, involving introduction of a functional copy of the human *TYMP* coding sequence (hcTYMP) into MNGIE patients' cells, could be a noninvasive alternative therapy that additionally would not require donor tissue. The existence of a murine model of the disease<sup>16</sup> has allowed this approach to be tested preclinically. Although this animal model does not recapitulate the clinical phenotype of the disease, probably due to the short life expectancy of mice, in combination with some differences in deoxynucleoside metabolism between mice and humans, it reproduces the biochemical imbalances observed in MNGIE patients, thus constituting a useful tool to investigate the effects of experimental therapies on the biomarkers of this disorder, that is, the systemic levels of dThd and dUrd.

Using this animal model, the feasibility of gene therapy was demonstrated using lentiviral vectors targeting the hematopoietic system. Syngeneic transplantation of transduced hematopoietic progenitors into the *Tymp/Upp1*<sup>-/-</sup> double knockout (KO) MNGIE model was able to correct the biochemical derangement occurring in the disease.<sup>17</sup> However, on long-term follow-up of treated mice, survival was low due to the transplantation procedure, which included total body irradiation of recipient animals before progenitor cell infusion.<sup>18</sup> An alternative approach, using an adeno-associated virus (AAV) vector targeting the liver, also prevented biochemical imbalances in mice. Intravenous ad-

ministration of the AAV vector containing hcTYMP at doses as low as  $2 \times 10^{11}$  genome copies/kg led to a permanent reduction in systemic dThd and dUrd levels to normal values in about 50% of treated mice, and higher doses reduced nucleoside levels in virtually all treated mice.<sup>19</sup> This study reports that the therapeutic effect achieved with the AAV vector persists throughout the life of the murine model with no signs of adverse effects.

## MATERIALS AND METHODS

### Vector construction, production, and titration

The AAV2/8 vector containing hcTYMP under the control of the thyroxine-binding globulin (*TBG*) promoter was constructed, produced by triple transfection of 293 cells, and titrated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and dot blot analysis, as indicated in a previous study.<sup>19</sup>

### Animal procedures

All animal procedures were performed using protocols approved by the authors' Institutional Review Board and committee on animal care and use. Eight- to 12-week-old *Tymp/Upp1*<sup>-/-</sup> mice<sup>16</sup> were treated with a single intravenous injection (tail vein) of AAV2/8-TBG-hcTYMP. Three groups of animals were treated with three different doses:  $2 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$ , and  $2 \times 10^{12}$  vector genomes (vg)/kg. Blood samples (EDTA) were collected from the saphenous vein 2 weeks before treatment and every 2–4 weeks after treatment, starting from week 1 and continuing for 28 weeks. Additional blood samples were collected 65, 75, 80, and 88 weeks after treatment. All the animals included in this study were males, except a subgroup of female mice used for the study on the influence of sex on the effect of the treatment.

When mice showed signs of pain, suffering, distress, or lasting harm, they were euthanized before the planned end of the study for humanitarian reasons, according to the following endpoint rule based on a scoring system included in the European Directive 2010/63/UE (Annex III 3.1 b). The parameters that were monitored were body weight, body condition, external appearance, and behavior. Each parameter was scored from 0 to 3 based on different indicators, and euthanasia was practiced in those mice whose score reached 3 in a single parameter or 5 in the sum of the different parameters.

### TP activity and nucleoside determination

Plasma dThd and dUrd concentrations were analyzed by high-performance liquid chromatog-

raphy with ultraviolet detection, as previously described.<sup>17</sup> TP activity and tissue nucleoside concentrations were measured in mice 34 weeks after treatment and in untreated, age-matched mice. After killing the mice by cervical dislocation, tissues were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Frozen samples were homogenized in lysis buffer (50 mM of Tris-HCl, pH 7.2, 10 mL/L of Triton X-100, 2 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2 mL/L of 2-mercaptoethanol) in a Potter homogenizer. The homogenates were centrifuged at 20,000 *g* for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and supernatants were separated into two aliquots. As described elsewhere, one aliquot was used for protein determination<sup>20</sup> and TP activity determination.<sup>21</sup> The other aliquot was frozen and later used to measure nucleosides by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). To prevent *in vitro* degradation of dThd and dUrd during the homogenization procedure, for samples with TP activities  $>100$  nmol Thy/h/mg prot, a second piece of tissue was homogenized in the presence of 100  $\mu\text{M}$  of 5-bromouracil (TP inhibitor) for the determination of these nucleosides. Thawed supernatants were centrifuged at 20,000 *g* for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to eliminate any remaining particles, and clean supernatants were deproteinized by ultrafiltration (10 kDa Amicon Ultra filters; Merck Millipore, Billerica, MA) at 14,000 *g* for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Five microliters of deproteinized homogenate were injected into an Acquity UPLC-MS/MS instrument (Acquity UPLC-Xevo TQ Mass Spectrometer; Waters, Milford, MA) using an Acquity UPLC BEH C18 column (100  $\times$  2.1 mm, 130  $\text{\AA}$  pore, 1.7  $\mu\text{m}$  particle; Waters). The components of the sample were resolved and detected, as previously described.<sup>19</sup> Calibration curves made with aqueous standards were processed in parallel, and concentrations were obtained from interpolation of the peak areas.

#### Vector copy number

DNA was extracted from liver with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Detection and quantification of vector genome copies per cell was performed by quantitative PCR (qPCR) in the ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). hcTYMP DNA was quantified using the pre-designed TaqMan MGB gene expression assay Hs00157317\_m1 (Applied Biosystems), and was referred to the single copy nuclear gene *Ang1* using the predesigned TaqMan MGB gene expression assay Mm00833184\_s1 (Applied Biosystems). The quantifications were based on a standard curve prepared with different

dilutions of vectors containing hcTYMP DNA or a specific region of the *Ang1* gene.

#### Liver mitochondrial dNTP quantification

Liver mitochondria were isolated, as previously described.<sup>8</sup> Isolated mitochondria (0.5 mg of protein) were treated with trichloroacetic acid (final concentration 0.5 M) and centrifuged at 20,000 *g* for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were neutralized with 1.5 volumes of 0.5 M tri-*N*-octylamine in Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane) and centrifuged for 10 min at 10,000 *g* at  $4^{\circ}\text{C}$ . Half the aqueous upper phase was recovered and dried under a speed vacuum. Dry dNTP extracts were dissolved in 40  $\mu\text{L}$  of 40 mM Tris-HCl (pH 7.4) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until measurement. For mitochondrial dNTP quantification, the previously described polymerase-based assay<sup>8</sup> was used with some modifications. Briefly, 10  $\mu\text{L}$  of reaction mixture contained 5  $\mu\text{L}$  of dNTP extract in 40 mM of Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM of dithiothreitol, 0.25  $\mu\text{M}$  of oligoprimer, 0.75  $\mu\text{M}$  of [ $8\text{-}^3\text{H}$ ]dATP, 12–21 Ci/mmol, and 0.25 units of Sequencing Taq DNA Polymerase (Bioron, Newtown Square, PA). Reaction mixtures with aqueous dNTP standards were processed in parallel. After incubation at  $48^{\circ}\text{C}$  for 60 min, 9  $\mu\text{L}$  of the mix was spotted onto one position of a DEAE Filtermat glass fiber filter (PerkinElmer, Waltham, MA) and left to dry. The filters were washed six times for 10 min with 5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , once with water, and once with absolute ethanol, and left to dry again. The filter was covered with a Melt-on Scintillator sheet (PerkinElmer), and the retained radioactivity was determined by scintillation counting in a MicroBeta2 Microplate counter (PerkinElmer). dNTP amounts were calculated from interpolation on the calibration curves. To ensure the reliability of the results, triplicates of two different dilutions of each dNTP extract (usually 1:3 and 1:10 water-diluted) were processed in each independent experiment.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The tests used are indicated in the figure legends. For statistical purposes, undetectable values were considered as zero.

## RESULTS

#### Treatment with AAV2/8-TBG-hcTYMP provides a dose-dependent, permanent nucleoside reduction

Blood samples were collected 2 weeks before treatment (baseline values) and at several time

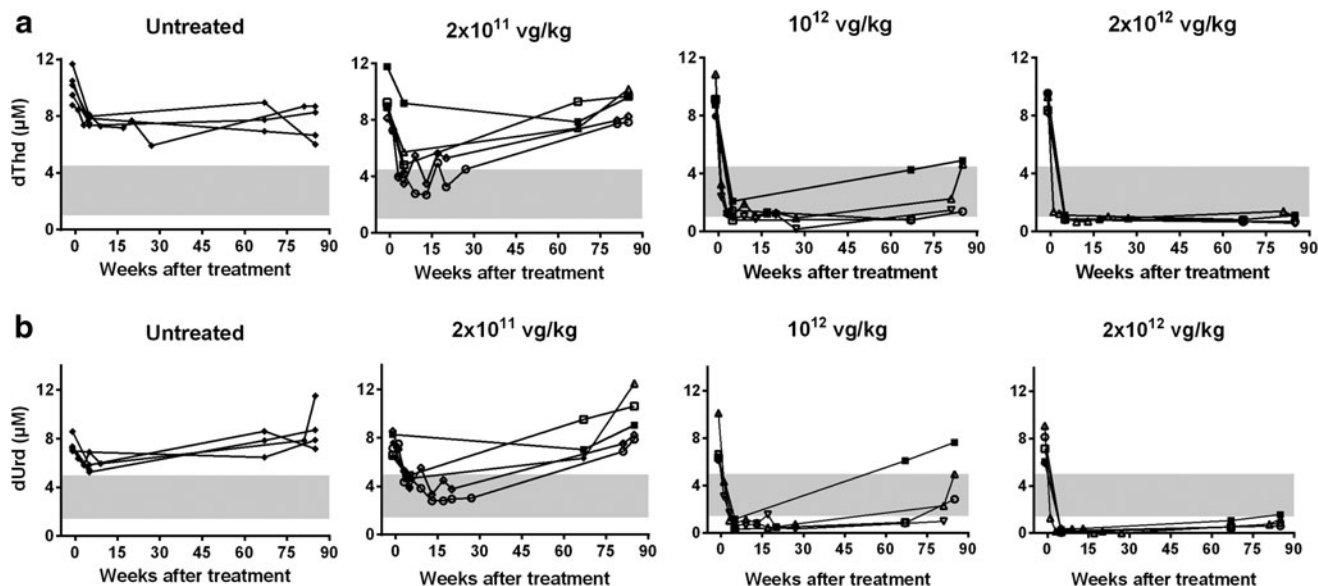
points over 88 weeks after treatment to measure nucleoside levels (Fig. 1). As was observed in a short-term study with the same vector,<sup>19</sup> the lowest dose ( $2 \times 10^{11}$  vg/kg) progressively reduced plasma dThd and dUrd concentrations, which reached normal levels 5 weeks after injection in most mice. However, this positive effect was gradually lost in all mice treated with this dose, and plasma dThd and dUrd concentrations returned to KO levels at the end of the study (88 weeks after treatment). Higher doses ( $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg) produced faster reductions in plasma nucleoside concentrations, which reached wild-type (wt) levels or below in all mice 1 week after vector injection. The effect was maintained over the entire monitoring time, although there was a slight rebound at the last analysis (88 weeks) with the intermediate dose ( $10^{12}$  vg/kg). Nonetheless, nucleoside levels in three of four mice treated with the intermediate dose remained within the wt range at that time.

Previous AAV studies in MNGIE have been performed in male mice, as sex-biased AAV transduction efficiency has been observed in rodents (higher in male mice than female mice).<sup>22</sup> Therefore, the study tested whether the treatment was also effective in females using two vector doses:  $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg. Although the small size of the sample would have compromised a reliable statistical analysis of the data, inspection of the results sug-

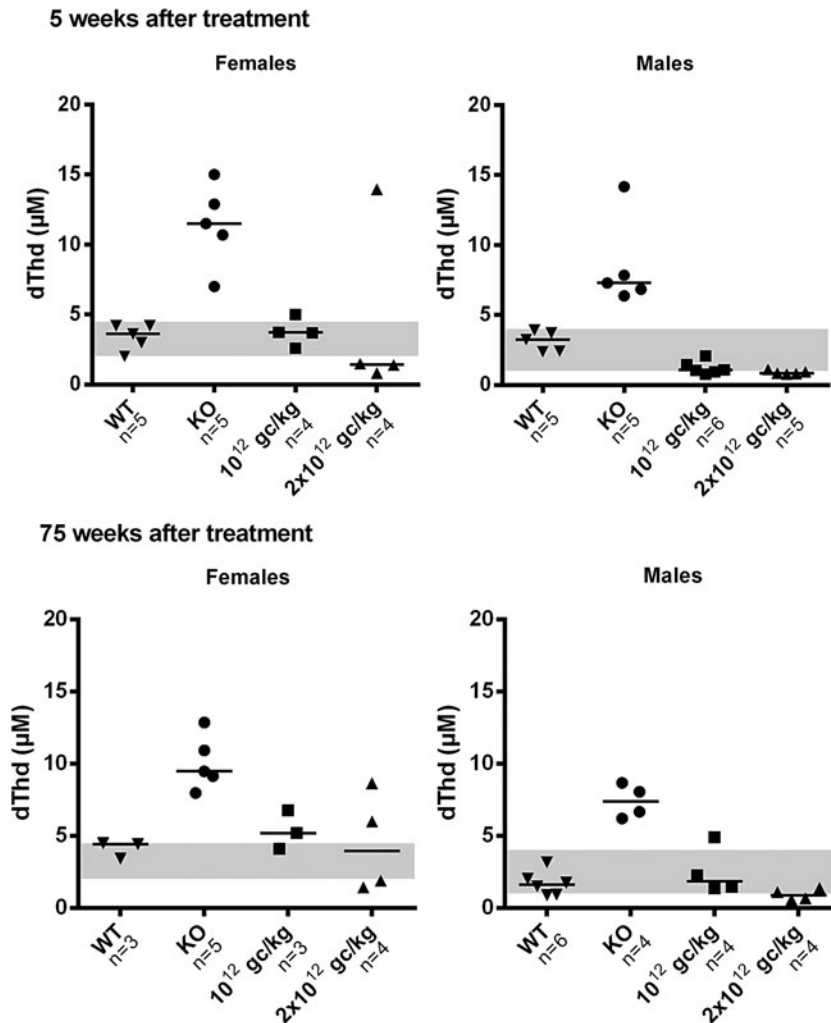
gests that the vector was effective in reducing systemic nucleoside levels in females, although the effect was quantitatively less pronounced than in males (Fig. 2). At 5 weeks following treatment, circulating dThd concentrations in female mice were lowered to wt levels with both doses (three of four mice for each dose). This reduction was maintained in females 75 weeks after treatment, but dThd levels persisted within the wt range in only one of three mice ( $10^{12}$  vg/kg) and two of four mice ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg). In addition, there were reductions in plasma dUrd levels (data not shown). Parallel experiments conducted in male mice showed similar results, but nucleoside reductions were slightly greater in males than females.

### AAV treatment restores dNTP balance in liver mitochondria

At 96 weeks of age, untreated KO mice showed significantly higher liver dThd and dUrd levels than those of their wt counterparts (Fig. 3), findings consistent with the previously reported results for younger animals (42 weeks).<sup>17</sup> These increases were found to be significantly lowered in a dose-dependent manner by treatment with the vector, given at 8 weeks of age. At a vector dose of  $2 \times 10^{11}$  vg/kg, nucleoside levels in the liver had decreased to wt values, and at higher doses, nucleosides had dropped to below normal values.



**Figure 1.** Plasma thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd) monitoring. dThd (a) and dUrd (b) concentrations in plasma obtained from untreated ( $n=5$ ) and adeno-associated virus (AAV)-treated knockout (KO) mice ( $n=6$  for  $2 \times 10^{11}$  and  $10^{12}$  vector genomes [vg]/kg, and  $n=5$  for  $2 \times 10^{12}$  vg/kg) over 88 weeks after treatment (time 0). Gray area indicates the plasma dThd and dUrd concentration range in wild-type (wt) mice ( $n=11$ ). To facilitate matching the results of each mouse between different figures, the same symbol identifies a particular mouse in Figs. 1, 3, and 4.



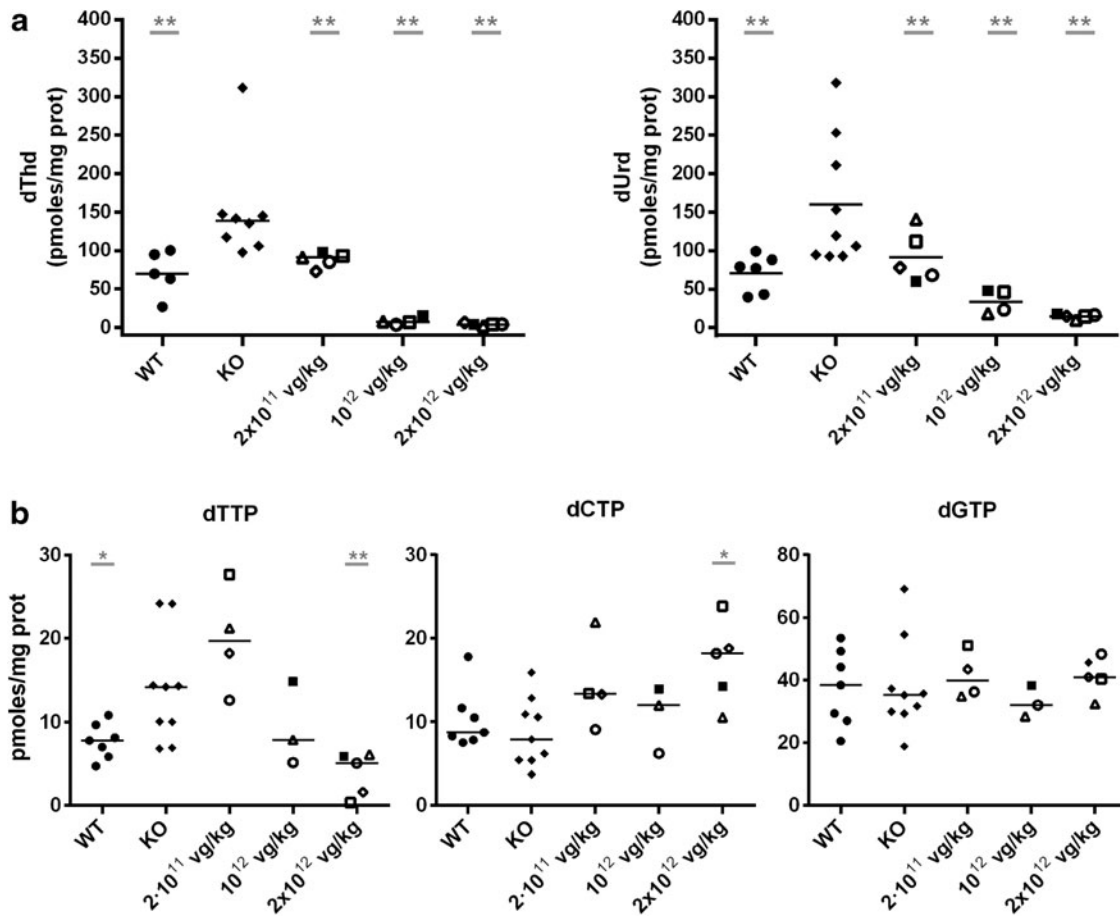
**Figure 2.** Plasma dThd clearance in male versus female mice. Plasma dThd concentrations in male and female KO mice 5 and 75 weeks after treatment. Doses are indicated on the *x*-axis (vg/kg). Horizontal lines represent medians. Gray areas indicate the plasma dThd concentration range in wt female ( $n=8$ ) and male ( $n=11$ ) mice.

Nucleosides are dNTP precursors within the salvage pathway. As a consequence of this biochemical linkage, dThd and dUrd overload causes a deoxythymidine triphosphate (dTTP) increase and secondary deoxycytidine triphosphate (dCTP) decrease in mitochondria of some tissues, including the liver, and so on.<sup>8,18,19,23</sup> These imbalances were partially or totally prevented by the treatment. Mitochondrial dCTP levels increased at all vector doses tested, whereas the mitochondrial dTTP increase was prevented, with reductions down to wt levels or below at doses of  $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg. dTTP remained unchanged at the lowest dose of  $2 \times 10^{11}$  vg/kg (Fig. 3). Mitochondrial deoxyguanosine triphosphate (dGTP) levels did not change with the treatment. dATP levels could not be measured in liver mitochondria because the

values obtained were below the lower limit of quantification.

#### Transgene copy number is diluted over time

Quantitative PCR analysis of DNA in the liver of mice treated with the AAV2/8-TBG-hcTYMP vector showed a small but noticeable dilution of the vector genomes per cell over time (Fig. 4). At the lowest vector dose, vector copy number per cell was already negligible at 8 months after treatment. At the two higher doses, vector copy number 8 months after treatment ranged from 0.1 to 1.8 vg/cell in 10 of 11 treated mice (median 0.35 and 0.46 vg/cell at doses of  $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg, respectively). At 21 months after treatment, vector copy number had decreased (median 0.04 and 0.32 vg/cell at  $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg, respective-



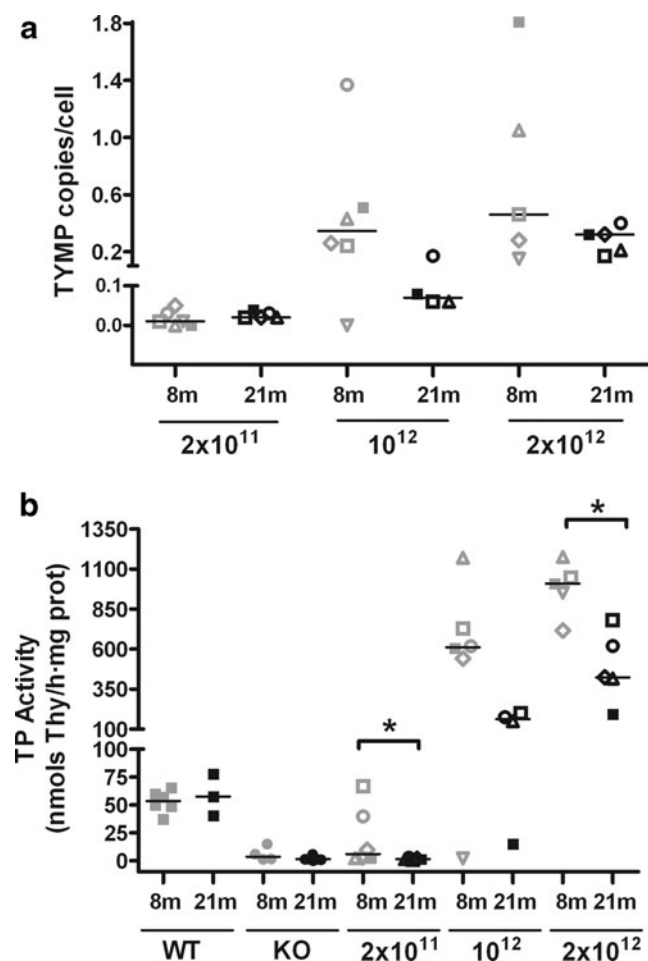
**Figure 3.** Nucleoside concentrations and mitochondrial nucleotide levels in the liver after long-term transgene expression. **(a)** dThd and dUrd concentrations in wt ( $n=5$ ), untreated KO ( $n=9$ ), and AAV-treated KO mice with  $2 \times 10^{11}$  ( $n=5$ ),  $10^{12}$  ( $n=4$ ), and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) 21 months (88 weeks) after treatment. **(b)** Mitochondrial deoxythymidine triphosphate (dTTP), deoxycytidine triphosphate (dCTP), and deoxyguanosine triphosphate levels in wt ( $n=7$ ), untreated KO ( $n=9$ ), and AAV-treated KO mice with  $2 \times 10^{11}$  ( $n=5$ ),  $10^{12}$  ( $n=4$ ), and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg ( $n=5$ ) 21 months after treatment. Horizontal lines represent medians. Gray underlined asterisks indicate statistical differences compared to untreated KO mice ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ , Mann-Whitney U-test). The group of mice treated with the higher vector dose had lower dTTP levels ( $p < 0.05$ ) and higher dCTP levels ( $p < 0.05$ ) than those of wt mice. To facilitate matching the results of each mouse between different figures, the same symbol identifies a particular mouse in Figs. 1, 3, and 4.

ly). This loss of vector copy number correlated with partial loss of TP activity over time. Eight months after treatment, KO mice gained TP activity in the liver in a dose-dependent manner, reaching wt values in two of six mice treated with the lowest dose, and approximate values of 600 to 1,000 nmol/h/mg of protein in mice treated with higher doses. Thirteen months later (21 months after treatment), TP activity had been lost in all mice treated with the lowest dose (consistent with the systemic nucleoside rebound observed in this group; Fig. 1), and reduced in those treated with the higher doses. It should be noted, however, that in most mice treated with higher doses (seven of eight) TP activities were maintained between 200 and 800 nmol/h/mg prot (fourfold increased or higher compared to wt values) at 21 months. The

correlation between vector copy number per cell and TP activity in treated mice was statistically significant ( $p < 0.0001$ ).

#### Treatment with AAV2/8-TBG-hcTYMP did not increase tumorigenesis or mortality rates

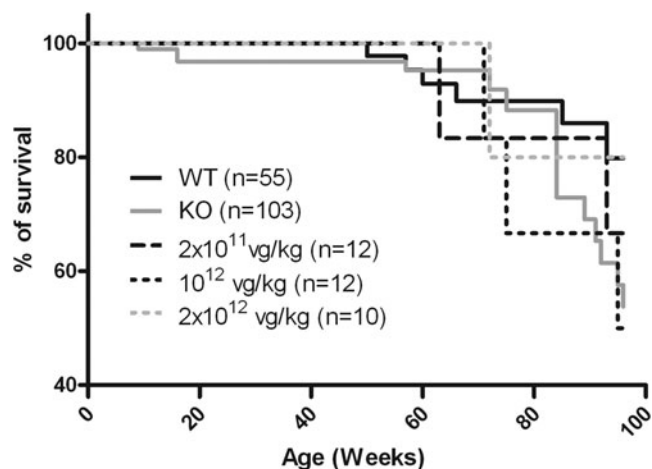
To investigate whether survival was affected in treated mice, mortality was followed up to the end of the study (96 weeks) in wt untreated KO and AAV-treated KO mice at all doses (Fig. 5 and Supplementary Table S1). Kaplan–Meyer analysis showed that median survival was not significantly different between wt and untreated KO mice (although a lower percentage of KO mice than wt mice were alive at the end of the study). The treatment did not affect survival of the animals at any dose, either positively or negatively (*i.e.*, median survival in



**Figure 4.** Vector genomes and thymidine phosphorylase (TP) activity in the liver. Quantitative polymerase chain reaction–assessed AAV genome copies in the liver from treated KO mice using a human *TYMP* cDNA probe (**a**), and TP activity in the liver of wt, untreated, and treated KO mice 8 and 21 months (88 weeks) after treatment (**b**). The number of animals in consecutive groups of panel (**a**) are, from left to right,  $n=6, 5, 6, 4, 5$ , and 5. The number of animals in consecutive groups of panel (**b**) are, from left to right,  $n=6, 3, 4, 11, 6, 5, 6, 4, 5$ , and 5. Horizontal lines represent medians. Doses are indicated on the *x*-axis (vg/kg). Asterisks indicate statistical differences between groups ( $*p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test). To facilitate matching the results of each mouse between different figures, the same symbol identifies a particular mouse in Figs. 1, 3, and 4.

mice treated with each vector dose did not significantly differ from that of untreated KO mice).

To detect the development of tumors, the organs of a group of mice killed at the end of the study or following the euthanasia recommendation according to the endpoint rule were carefully examined (see Materials and Methods). This analysis only included macroscopic visualization of organs at necropsies, without organ dissection or microscopic analyses. The findings of this examination are summarized in Table 1. The limited number of treated animals examined and the variability of the tumors found precludes definitive conclusions, but



**Figure 5.** Survival curve. Kaplan–Meier survival representation of wt, untreated KO, and treated KO mice.

the incidence of liver tumors (target tissue of the study) was not higher in AAV-treated KO mice than in wt or untreated KO mice in the overall data analysis.

## DISCUSSION

MNGIE is caused by systemic accumulation of dThd and dUrd, which interfere with mtDNA replication and maintenance in certain tissues that are particularly susceptible to injury by increased nucleoside levels. Consequently, current MNGIE therapies have focused on preventing dThd and dUrd overload in several target tissues, as has been reviewed.<sup>24</sup> Past experience has shown that MNGIE therapies are effective only when the systemic nucleoside reduction is sustained over time,<sup>12–15</sup> and preclinical evidence indicates that this objective can

**Table 1.** Tumorigenesis study

Group/dose	Total studied	Number of mice with tumors <sup>a</sup>	Tumors detected
WT	16	3 (19%)	1 (spleen, liver, and lung), 2 (spleen)
KO	30	6 (20%)	2 (lung), 2 (small intestine), 1 (liver), 1 (spleen, kidney, and liver)
$2 \times 10^{11}$ vg/kg	6	2 (33%)	1 (lung), 1 (small intestine and lung)
$10^{12}$ vg/kg	6	1 (17%)	1 (lung)
$2 \times 10^{12}$ vg/kg	5	2 (40%)	1 (liver), 1 (small intestine and lung)

Specific subsets of animals belonging to different groups were selected at the beginning of the study to investigate the occurrence of tumors at the end of the study (when they were killed at the end of the study, or before the end of the study following the endpoint rule for humanitarian reasons).

<sup>a</sup>Tumors found in necropsies at the end of the study (age 96 weeks) or after euthanasia.

wt, wild type; KO, knockout; vg, vector genomes.



be achieved using gene therapy. Gene therapy strategies based on a lentiviral vector targeting the hematopoietic system or an AAV targeting the liver have shown biochemical efficacy in a murine model of the disease.<sup>17–19</sup> In the case of hematopoietic tissue transduced with a lentiviral vector, the effect is maintained over the life of treated mice, but the procedure itself is associated with a reduction in the animals' life span. The present study reports that treatment with AAV2/8-TBG-hcTYMP targeting the liver in a murine model also provides a permanent biochemical correction, but without adverse effects.

A previous report found that various doses of this vector lowered dThd and dUrd in the blood and several tissues for at least 34 weeks after treatment.<sup>19</sup> In this study, it was observed that the biochemical correction is fully maintained over the entire life of most mice treated with  $10^{12}$  vg/kg and all mice treated with  $2 \times 10^{12}$  vg/kg. At the lowest dose tested ( $2 \times 10^{11}$  vg/kg), the biochemical effect persisted for the first 30 weeks (consistent with the results of a previous study) but was lost thereafter in all animals. This loss of effect coincided and correlated with a reduction in vector genomes and TP activity in the liver. Some dilution effect was expected for AAVs because they mainly remain as episomes in the nucleus of transduced cells.<sup>25</sup> The average hepatocyte turnover time in uninjured liver of adult mice is 150 days.<sup>26</sup> Therefore, an 85% vg/cell reduction would be expected in 350 days (between 8 and 21 months, the times at which this endpoint was assessed). Accurate quantification of this reduction was difficult in this study because vector copy number in the liver cannot be assessed twice in the same mouse (liver biopsies stimulate hepatocyte proliferation, leading to overestimation of the dilution effect), and the wide dispersion of copy number data (illustrated in Fig. 4a) makes precise copy number assessment difficult in different mice at different times. However, the data seem to indicate that the reductions were less marked than was expected, especially for the highest vector dose. At the lowest dose, vector copy number was already barely detectable 8 months after treatment.

The dilution effect was also less pronounced than expected when assessed in terms of liver TP activity. Among the factors that could account for retention of copy number and TP activity, a small but relevant proportion of AAV may have been integrated in the genome of hepatocytes<sup>25</sup> and replicated in parallel with cell division. A dilution effect is not expected (and is not observed) when a lentiviral vector is used because these vectors integrate in the genome and are not diluted when cells divide.<sup>17,18</sup> In humans, the turnover time of mature hepatocytes in a fully

developed, uninjured liver ranges from 200 to 300 days.<sup>27</sup> Hence, dilution of the AAV therapeutic effect along time is also expected. Data from the single related clinical trial reported to date, in which hemophilia B was treated with a scAAV8 targeting the liver, have shown that factor IX expression (product of the transgene in this clinical study) is stable for >5 years.<sup>28,29</sup> These results indicate that the dilution effect in humans may be slow enough to be undetectable in this moderate time frame. However, huge efforts in the field of AAV gene therapy are aimed at developing new capsid vectors compatible in terms of immunogenicity with a second vector infusion in order to overcome issues derived from the long-term dilution effect.

An impact of sex on liver transduction with AAVs is well recognized in the literature, with greater transduction efficiency reported in males than females.<sup>22,30–33</sup> Previous studies in other murine models have proposed various explanations for the higher transgenic expression in male mice, such as an interaction between the AAV ITR and testosterone-dependent host nuclear regulatory proteins<sup>22</sup> and contact between AAV vectors and inhibitory molecules present in the blood.<sup>30</sup> Only male mice were used in the authors' first study on AAV,<sup>19</sup> but the experience was expanded to both male and female mice in the present study. The results indicate that AAV treatment is effective in both sexes, although the reduction in plasma nucleosides is more pronounced in males than it is in females. Since a single intravenous injection was used, both the above-mentioned explanations could account for the differences between sexes. Nevertheless, it is important to note that evidence from studies in nonhuman primates and patients suffices to affirm that this difference only pertains to rodents.<sup>34</sup> Therefore, the sex-related differences observed here are not relevant when considering the use of this approach to treat MNGIE patients.

The liver is an advantageous target organ for gene correction in MNGIE patients, not only because of its immunological tolerance, which limits the immune response against the vector capsid and TP protein, but also because it is one of the richest organs in TP activity in humans,<sup>21,35</sup> and a particularly suitable tissue to host systemic clearance of metabolites.

TP activity was found to be 3- to 14-fold higher in the murine model than in wt mice at 21 months after treatment with the highest vector dose. This high activity resulted in excessively reduced nucleoside levels in the blood, which could be a concern, as this could lead to dTTP depletion in quiescent hepatocytes. Since *de novo* dTTP synthesis is cell-cycle de-

pendent and downregulated in nondividing cells, hepatocyte dTTP levels mainly depend on the salvage pathway and would be affected by abnormally low dThd levels. It was found that the dThd over-reduction observed at the highest vector dose was associated with slight mitochondrial depletion of dTTP (below wt values) and expansion of dCTP (above wt values). Hence, it is concluded that the dose-dependent effect on blood nucleoside levels is reflected downstream in the mitochondrial salvage pathway by inducing a dose-dependent dTTP reduction and dCTP expansion, although the above-mentioned over-corrections point out the difficulty of finely adjusting the vector dose to reach the wt dNTP levels. Of note, 21 months after treatment with the lowest vector dose, dTTP remained at KO levels, as also occurred with blood dThd levels in the same group and at the same time. By contrast, liver dThd levels were normal. The reason for these inconsistent findings is unknown, and some bias derived from the low number of available samples from old animals cannot be ruled out. In contrast to the changes observed in pyrimidine deoxynucleotides, mitochondrial dGTP levels were not affected by the treatment.

The effect of the treatment on nucleoside and mitochondrial nucleotide levels underlines the importance of adjusting the vector dose in patients so that excessive TP activity will not change the dNTP pool beyond the objectives of the treatment. However, it is unlikely that the doses tested here will result in liver TP activities higher than normal in humans. Liver TP activities in mice treated with the highest dose were still around four times lower than the normal values in human liver.<sup>21</sup> Even considering that we were testing a human gene under a human promoter in mice, this observation suggests that if use of this vector were translated to patients, the concern would not be *TYMP* overexpression but instead the inability to reach TP levels high enough to normalize systemic nucleoside concentrations. The fact that AAV8 transduction efficiency in rodents is higher than in humans<sup>36,37</sup> reinforces this viewpoint. Which is the best serotype to target human liver is a relevant and controversial issue. Some studies in humanized mouse models suggest that AAV3-derived engineered serotypes infected human cells much more efficiently than AAV8,<sup>36–38</sup> while other studies do not support this conclusion, showing instead similar efficiencies.<sup>39,40</sup>

There is considerable controversy regarding the oncogenic potential of AAV use in gene therapy, and several studies have been reported with rather

conflicting results. In one experimental study in mice, hepatocellular carcinoma developed after injection of a therapeutic AAV due to integration of the vector into a genomic region encoding numerous regulatory RNAs.<sup>41</sup> Furthermore, AAV2 infection has been associated with oncogenic insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinoma.<sup>42</sup> However, other authors have found no associated increase in tumorigenesis with AAV use in mice,<sup>43,44</sup> and a recent study reported an absence of hepatic genotoxicity in relation to systemic administration of an AAV2/5 in nonhuman primates and acute intermittent porphyria patients.<sup>45</sup> In another study, random AAV integration in several loci, including mtDNA, was reported,<sup>46,47</sup> but the findings were considered largely artefactual by others.<sup>48</sup> These discrepancies have been attributed to differing experimental conditions.<sup>49</sup> It has also been hypothesized that the enhancer–promoter encoded by the vector can influence its genotoxicity, as it can lead to overexpression of the genes located close to the integration site.<sup>49</sup> This study used the TBG promoter, which has been associated with insertional mutagenesis.<sup>49</sup> Nonetheless, in this study, the incidence of liver tumors in AAV-treated mice was similar to the spontaneous hepatocellular carcinoma incidence in wt and untreated KO mice and to the rates described in other studies.<sup>49–51</sup> The small size of the cohort of treated mice does not allow an increased incidence of tumors to be ruled out. A dedicated study with higher numbers of mice is needed to address this potential issue, but this objective is beyond the scope of this study. Of note, this study treated adult mice and not newborns, and the doses administered were 50 times lower than those resulting in tumorigenesis.<sup>49</sup> Thus, at the doses used, it seems that the genotoxic potential of the vector is low, but the therapeutic benefit is retained. To verify the safety of the vector further, a Kaplan–Meier analysis was performed, which found no association of the treatment with higher mortality in this study.

This extended study provides further evidence that gene therapy using an AAV targeting the liver is a feasible therapeutic option for MNGIE treatment. Among the variables that can influence the success of this therapy, selection of the appropriate vector dose is one of the most important to be considered. A vector dose range is described that allows long-term correction and did not show adverse effects derived from transgene overexpression or vector genotoxicity, although more detailed and expanded studies are needed to ensure the safety of

the treatment. This information may be of value for designing and implementing future clinical trials with MNGIE patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (Grant PI15/00465 to R.M., co-funded

with FEDER funds), and the French Muscular Dystrophy Association–Téléthon (AFM Téléthon Postdoctoral Grant 18247 to J.T.).

## AUTHOR DISCLOSURE

No competing financial interests exist.

## REFERENCES

- Hirano M, Garcia-de-Yebenes J, Jones AC, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am J Hum Genet* 1998;63:526–533.
- Hirano M, Nishigaki Y, Marti R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* 2004;10:8–17.
- Hirano M, Silvestri G, Blake DM, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994;44:721–727.
- Marti R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:14–18.
- Marti R, Nishigaki Y, Vila MR, et al. Alteration of nucleotide metabolism: a new mechanism for mitochondrial disorders. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:845–851.
- Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2011;134:3326–3332.
- Garcia-Diaz B, Garone C, Barca E, et al. Deoxynucleoside stress exacerbates the phenotype of a mouse model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy. *Brain* 2014;137:1337–1349.
- Gonzalez-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL, et al. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* 2011;7:e1002035.
- Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, et al. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281:22720–22728.
- Song S, Wheeler LJ, Mathews CK. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2003;278:43893–43896.
- Halter J, Schupbach WM, Casali C, et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:330–337.
- Halter JP, Michael W, Schupbach M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2015;138:2847–2858.
- Hirano M, Marti R, Casali C, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1458–1460.
- D'Angelo R, Rinaldi R, Pironi L, et al. Liver transplant reverses biochemical imbalance in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Mitochondrion* 2017;34:101–102.
- De Giorgio R, Pironi L, Rinaldi R, et al. Liver transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Ann Neurol* 2016;80:448–455.
- Lopez LC, Akman HO, Garcia-Cazorla A, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18:714–722.
- Torres-Torronteras J, Gomez A, Eixarch H, et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* 2011;18:795–806.
- Torres-Torronteras J, Cabrera-Perez R, Barba I, et al. Long-term restoration of thymidine phosphorylase function and nucleoside homeostasis using hematopoietic gene therapy in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2016;27:656–667.
- Torres-Torronteras J, Viscomi C, Cabrera-Perez R, et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther* 2014;22:901–907.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- Valentino ML, Marti R, Tadesse S, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* 2007;581:3410–3414.
- Davidoff AM, Ng CY, Zhou J, et al. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 2003;102:480–488.
- Lopez-Estevéz S, Ferrer G, Torres-Torronteras J, et al. Thymidine phosphorylase is both a therapeutic and a suicide gene in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Gene Ther* 2014;21:673–681.
- Cabrera-Pérez R, Torres-Torronteras J, Vila-Julà F, et al. Prospective therapeutic approaches in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Expert Opin Orphan Drugs* 2015;3:1167–1182.
- Nakai H, Yant SR, Storm TA, et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol* 2001;75:6969–6976.
- Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, et al. Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver. *Liver* 2002;22:419–425.
- Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 2009;137:466–481.
- Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994–2004.
- Nienhuis AW, Nathwani AC, Davidoff AM. Gene therapy for hemophilia. *Hum Gene Ther* 2016;27:305–308.
- Berraondo P, Cretaz J, Ochoa L, et al. Intrahepatic injection of recombinant adeno-associated virus serotype 2 overcomes gender-related differences in liver transduction. *Hum Gene Ther* 2006;17:601–610.
- Dane AP, Cunningham SC, Graf NS, et al. Sexually dimorphic patterns of episomal rAAV genome persistence in the adult mouse liver and correlation with hepatocellular proliferation. *Mol Ther* 2009;17:1548–1554.
- Paneda A, Vanrell L, Mauleon I, et al. Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther* 2009;20:908–917.
- Sun B, Zhang H, Franco LM, et al. Correction of glycogen storage disease type II by an adeno-

- associated virus vector containing a muscle-specific promoter. *Mol Ther* 2005;11:889–898.
34. Pañeda A, Lopez-Franco E, Kaeppl C, et al. Safety and liver transduction efficacy of rAAV5-cohPBGD in nonhuman primates: a potential therapy for acute intermittent porphyria. *Hum Gene Ther* 2013;24:1007–1017.
35. Boschetti E, D'Alessandro R, Bianco F, et al. Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS One* 2014;9:e96692.
36. Lisowski L, Dane AP, Chu K, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* 2014;506:382–386.
37. Vercauteren K, Hoffman BE, Zolotukhin I, et al. Superior *in vivo* transduction of human hepatocytes using engineered AAV3 capsid. *Mol Ther* 2016;24:1042–1049.
38. Kay MA. Selecting the best AAV capsid for human studies. *Mol Ther* 2015;23:1800–1801.
39. Li S, Ling C, Zhong L, et al. Efficient and targeted transduction of nonhuman primate liver with systemically delivered optimized AAV3B vectors. *Mol Ther* 2015;23:1867–1876.
40. Wang L, Bell P, Somanathan S, et al. Comparative study of liver gene transfer with AAV vectors based on natural and engineered AAV capsids. *Mol Ther* 2015;23:1877–1887.
41. Donsante A, Miller DG, Li Y, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 2007;317:477.
42. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015;47:1187–1193.
43. Bell P, Wang L, Leberer C, et al. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther* 2005;12:299–306.
44. Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* 2011;117:3311–3319.
45. Gil-Farina I, Fronza R, Kaeppl C, et al. Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients. *Mol Ther* 2016;24:1100–1105.
46. Kaeppl C, Beattie SG, Fronza R, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* 2013;19:889–891.
47. Kaeppl C, Beattie SG, Fronza R, et al. Reply to: NGS library preparation may generate artifactual integration sites of AAV vectors. *Nat Med* 2014;20:578–579.
48. Cogne B, Snyder R, Lindenbaum P, et al. NGS library preparation may generate artifactual integration sites of AAV vectors. *Nat Med* 2014;20:577–578.
49. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 2015;125:870–880.
50. Jeganathan K, Malureanu L, Baker DJ, et al. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol* 2007;179:255–267.
51. Mahler JF, Stokes W, Mann PC, et al. Spontaneous lesions in aging FVB/N mice. *Toxicol Pathol* 1996;24:710–716.

Received for publication July 26, 2017;  
accepted after revision December 14, 2017.

Published online: December 28, 2017.



# Alpha-1-Antitrypsin Promoter Improves the Efficacy of an Adeno-Associated Virus Vector for the Treatment of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy

Raquel Cabrera-Pérez,<sup>1,2</sup> Ferran Vila-Julià,<sup>1,2</sup> Michio Hirano,<sup>3</sup> Federico Mingozzi,<sup>4,5</sup> Javier Torres-Torronteras,<sup>1,2</sup> Ramon Martí<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; <sup>2</sup>Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Neurology, H. Houston Merritt Neuromuscular Research Center, Columbia University Medical Center, New York, New York; <sup>4</sup>Genethon and INSERM U951, Evry, France; <sup>5</sup>University Pierre and Marie Curie, Paris, France.

Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is a devastating disease caused by mutations in *TYMP*, which encodes thymidine phosphorylase (TP). In MNGIE patients, TP dysfunction results in systemic thymidine and deoxyuridine overload, which interferes with mitochondrial DNA replication. Preclinical studies have shown that gene therapy using a lentiviral vector targeted to hematopoietic stem cells or an adeno-associated virus (AAV) vector transcriptionally targeted to liver are feasible approaches to treat MNGIE. Here, we studied the effect of various promoters (thyroxine-binding globulin [TBG], phosphoglycerate kinase [PGK], hybrid liver-specific promoter [HLP], and alpha-1-antitrypsin [AAT]) and DNA configuration (single stranded or self complementary) on expression of the *TYMP* transgene in the AAV8 serotype in a murine model of MNGIE. All vectors restored liver TP activity and normalized nucleoside homeostasis in mice. However, the liver-specific promoters TBG, HLP, and AAT were more effective than the constitutive PGK promoter, and the self-complementary DNA configuration did not provide any therapeutic advantage over the single-stranded configuration. Among all constructs, only AAV-AAT was effective in all mice treated at the lowest dose ( $5 \times 10^{10}$  vector genomes/kg). As use of the AAT promoter will likely minimize the dose needed to achieve clinical efficacy as compared to the other promoters tested, we propose using the AAT promoter in the vector eventually designed for clinical use.

**Keywords:** MNGIE, AAV, *TYMP*, thymidine, promoter, mitochondria

## INTRODUCTION

MITOCHONDRIAL NEUROGASTROINTESTINAL encephalomyopathy (MNGIE) is a rare autosomal recessive disease caused by mutations in the nuclear gene *TYMP*, which encodes thymidine phosphorylase (TP).<sup>1</sup> The main features of MNGIE are severe gastrointestinal dysmotility, cachexia, progressive external ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, leukoencephalopathy, and signs of mitochondrial dysfunction in muscle biopsy. It is a devastating disorder, as around 80% of patients do not survive beyond 40 years. Complications derived from the gastrointestinal dysfunction and critical nutritional status are the most common causes of death.<sup>2</sup>

In MNGIE patients, TP dysfunction results in systemic accumulation of TP substrates, the nucle-

osides thymidine (dThd) and deoxyuridine (dUrd),<sup>3</sup> which leads to a mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) imbalance that interferes with mitochondrial DNA (mtDNA) replication.<sup>4,5</sup> More specifically, increased dThd concentration results in expansion of thymidine triphosphate (dTTP) and secondary depletion of deoxycytidine triphosphate (dCTP) in mitochondria.<sup>6</sup> mtDNA replication is affected, and muscle and other tissues show mtDNA depletion, as well as multiple deletions and somatic point mutations, which account for the mitochondrial dysfunction and clinical phenotype.<sup>7-9</sup> Several therapies have been proposed for MNGIE patients, with the common aim of achieving permanent clearance of the toxic systemic metabolites.<sup>10-13</sup> Nonetheless, only allogeneic hematopoietic stem cell

\*Correspondence: Dr. Ramon Martí, Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Pg. Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. E-mail: ramon.marti@vhir.org

transplantation and more recently, orthotopic liver transplantation have achieved sustained reductions in nucleoside concentrations to undetectable (or barely detectable) levels and an improvement in the clinical outcome.<sup>14–18</sup> However, both of these interventions are associated with considerable mortality rates and complications, which are particularly pronounced in MNGIE patients because of their poor medical condition at the time of treatment.<sup>14,19</sup> The difficulty of finding a compatible donor is an additional limitation of these treatments.

Based on this background, it seems evident that there is a need to develop safer therapeutic approaches for MNGIE, and to this end, gene therapy could be an option. We first explored the feasibility of gene therapy for this purpose in preclinical *in vitro* and *in vivo* models using a lentiviral vector targeting hematopoietic stem cells.<sup>20</sup> The results were consolidated in a follow-up study in lentivirus-treated animals<sup>21</sup> that showed long-term transgene expression and sustained biochemical normalization. However, lentiviral vectors are associated with a risk of oncogenesis because of their integrative nature.<sup>22</sup> To overcome this drawback, we later developed an alternative strategy based on use of an adeno-associated virus (AAV) vector transcriptionally targeted to the liver. Our previous results in

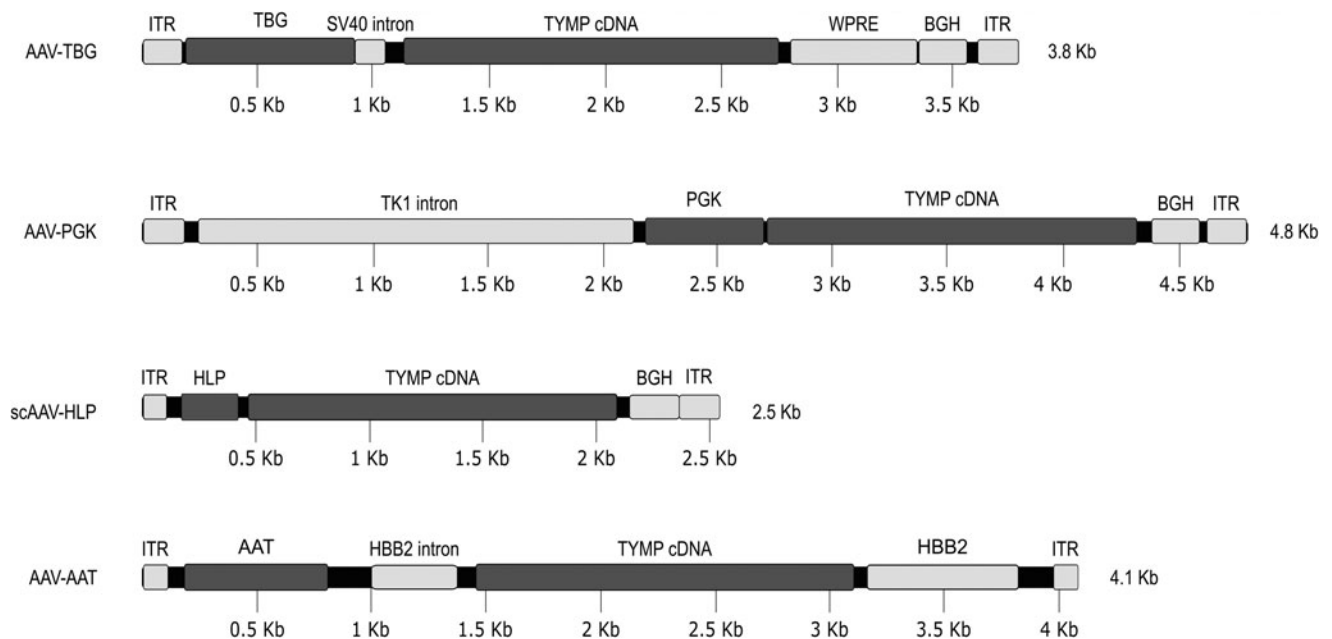
a murine model of MNGIE using thyroxine-binding globulin (TBG) promoter (AAV2/8-TBG vector) demonstrated that AAV-mediated liver-targeted *TYMP* expression normalizes nucleoside metabolism<sup>23</sup> in a sustained long-term effect.<sup>24</sup>

However, gene therapy has been associated with a dose-dependent immune response, and therefore, it is preferable to minimize the vector dose administered.<sup>25–27</sup> In this line, we have now focussed on investigating several alternative vectors having different promoters and DNA configurations. Specifically, we studied the effect of four promoters, the constitutive phosphoglycerate kinase (PGK) promoter and three liver-specific promoters—TBG promoter, hybrid liver-specific promoter (HLP), and alpha-1-antitrypsin (AAT) promoter—and two DNA configurations—single-stranded DNA and self-complementary DNA—on expression of the *TYMP* transgene when used in the AAV2/8 serotype in a murine model of the disease.

## MATERIALS AND METHODS

### AAV vector construction, production, and titration

A schematic representation of the four vectors investigated in this study is shown in Figure 1. In all cases, the AAV2/8 serotype was used.



**Figure 1.** Schematic representation of the four adeno-associated virus (AAV) vectors studied. In all cases, vector serotype corresponded to AAV2/8. ITR, inverted terminal repeats; TBG, thyroxine-binding globulin promoter; hcTYMP DNA, human thymidine phosphorylase gene coding sequence; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptionally regulatory element; BGH, bovine growth hormone polyadenylation signal; *TK1* intron, stuffer DNA corresponding to the human thymidine kinase 1 (*TK1*) intron 3 sequence; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; HLP, hybrid liver-specific promoter; AAT,  $\alpha$ -1-antitrypsin promoter; HBB2 intron, human haemoglobin subunit  $\beta$ -2 intron sequence; HBB2, bovine haemoglobin subunit  $\beta$ -2 polyadenylation signal; scAAV, self-complementary adeno-associated vector.

The AAV-TBG vector was generated at the AAV Vector Core of the Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli, Italy), as previously detailed.<sup>23</sup> Briefly, the coding sequence of the human *TYMP* gene (hcTYMP) was PCR amplified, cloned into the pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA), sequence verified, and finally cloned into the single *EagI* restriction site of the AAV2/8-TBG vector. The vector was produced by transfection of 293 cells and purified by CsCl gradient.

For generation of the AAV-PGK vector, the intron 3 sequence of *TK1* was PCR amplified, subcloned into the TOPO-TA vector (Invitrogen), and finally cloned between the *HindIII* and *EcoRV* restriction sites in the pSMD2 plasmid. The PGK promoter and hcTYMP sequences were obtained from the previously described p305-TP lentiviral vector<sup>20</sup> and subcloned between the *XhoI* and *XbaI* restriction sites of the pcDNA3.1(+) plasmid. Finally, the PGK-hcTYMP fragment was cloned between the *NotI* and *PmeI* restriction sites of the pSMD2 plasmid to obtain the AAV-PGK vector. After sequence verification, the vector was produced by the Vectors Production Unit of the Animal Biotechnology and Gene Therapy Centre (Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Catalonia), by triple transfection of 293 cells. The vector was purified by iodixanol gradient following previous polyethylene glycol precipitation.

For construction of the self-complementary AAV-HLP (scAAV-HLP) vector, the pAV-HLP-Luc plasmid was provided by Dr. Natwani's group (University College London Cancer Institute, London, United Kingdom). The Luciferase gene was replaced by the hcTYMP sequence, which was cloned into the *XbaI* restriction site. Then, the HLP-hcTYMP fragment was purified and cloned into the *SnaBI* restriction site of the custom-synthesized scAAV-pA plasmid (GeneArt Platform, Life Technologies). The final scAAV-HLP vector was sequence-verified and produced by the Vectors Production Unit following the protocol described for the AAV-PGK vector.

Finally, for construction of the AAV-AAT vector, the hcTYMP sequence was obtained from the scAAV-HLP vector and cloned between the *XbaI* and *XhoI* restriction sites of the pSMD2-ApoE-hAAT-UGT1A1-2.1 plasmid. After sequence verification, production was carried out following a protocol based on triple transfection of 293 cells and CsCl gradient purification.

The vectors produced were titrated in our laboratory following a previously described method based on double-stranded DNA quantification using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit

(ThermoFisher Scientific).<sup>28</sup> The AAV titer was calculated as the difference between the vector genomes value from lysed samples and the vector genome values for non-lysed samples, in order to quantify encapsidated DNA only. In the case of the AAV-TBG vector (previously tested and reported)<sup>23</sup> vector doses were recalculated according to the titers obtained by the picogreen method.

#### Animal procedures

All animal procedures were performed in accordance with protocols approved by our institutional review board. Male *Tymp<sup>-/-</sup>/Upp1<sup>-/-</sup>* double knock-out (KO) mice, 8–12 weeks old, were treated with a single intravenous tail injection of the different vectors at different doses:  $5 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{11}$  and  $5 \times 10^{11}$  vg/kg for the TBG vector;  $5 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg for the AAT vector and  $2 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $10^{12}$  and  $2 \times 10^{12}$  vg/kg for the PGK and HLP vectors. Age-matched untreated double KO and wild type (wt) mice were used as controls. Saphenous vein blood samples were collected weekly during the first month and every 2–4 weeks up to 28 weeks after treatment using EDTA capillaries (Microvette 200K3E, Sarstedt) to assess plasma nucleoside concentration and alanine aminotransferase (ALT) activity. Body weight was monitored and general health status assessed by qualitative survey (e.g., movement, coat appearance, behavior) throughout the study. Mice were killed by cervical dislocation 34 weeks after vector administration. At this point, intracardiac blood was extracted for dThd and dUrd determination and tissue samples were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for different purposes.

#### Nucleoside and TP activity determinations

Plasma dThd and dUrd concentrations were analyzed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorption detection, as previously described.<sup>20</sup> For TP activity and tissue nucleoside determinations, a portion of frozen sample was homogenized in TP activity lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.2; 10 mL/L Triton X-100; 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 0.2 mL/L 2-mercaptoethanol), using a Potter S homogenizer. Homogenates were centrifuged at 20,000 *g* for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and supernatants were separated into two aliquots. One aliquot was used for protein determination<sup>29</sup> and TP activity<sup>30</sup> determination, as reported. The other aliquot was frozen until use for measurement of nucleoside concentration by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.<sup>23</sup>



### ALT activity determination

To test whether the treatment induced hepatocellular toxicity, plasma ALT activity was monitored by periodic determinations (every 4 weeks) over the post-treatment period using a spectrophotometric method. ALT-mediated transamination of alanine to  $\alpha$ -ketoglutarate was coupled to reduction of the product pyruvate via lactate dehydrogenase, with nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) consumption spectrophotometrically monitored at  $\lambda=340$  nm. Fifty microliters of plasma was incubated for 10 min at 37°C in 720  $\mu$ L of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 44 mM L-alanine, 0.2 mM NADH, and 1 U/mL of lactate dehydrogenase. Absorbance at 340 nm was monitored for 10 min (blank), and the ALT reaction was then triggered by the addition of 80  $\mu$ L of 130 mM  $\alpha$ -ketoglutarate to follow the slope for an additional 10 min. ALT activity was expressed as micromoles of pyruvate formed per minute and liter of plasma (IU/L) based on the molar extinction coefficient of NADH at 340 nm [6300 L/(mol·cm)].

### Western blot

Protein extracts were obtained by homogenization of approximately 20 mg of tissue in TP activity lysis buffer. In all cases, 20  $\mu$ g of total protein was electrophoresed on 10% polyacrylamide gel under denaturing conditions, and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes using the Bio-Rad semi-dry system. Transferred proteins were blotted with a rabbit polyclonal TP antibody (ab69120, Abcam), a mouse monoclonal  $\beta$ -actin antibody (A5316, Sigma-Aldrich), or a mouse monoclonal GAPDH antibody (GA1R, Ambion). Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako) were used as secondary antibodies. Finally, membranes were treated with the Immobilon Western chemiluminescent kit (Merck Millipore), and bands were visualized in an ODYSSEY Fc (Li-COR) detector and quantified using Image J software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD).

### Histological analysis

Immunofluorescent histological analysis of human TP was performed in 10  $\mu$ m liver cryosections fixed with acetone:methanol (1:1 v/v). Sections were then blocked with bovine serum albumin 2% (w/v) in Tris buffered saline buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6; 125 mmol/L NaCl) for 30 minutes and incubated with 10  $\mu$ g/mL anti-TP rabbit polyclonal antibody (Abcam) overnight at 4°C. After washing, sections were stained with AlexaFluor

488 conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Invitrogen). Nuclear staining was performed with 1  $\mu$ g/mL Hoechst 33342.

### Liver mitochondrial dNTP measurement

Liver mitochondria were isolated as previously described.<sup>6</sup> A volume (0.1–0.3 mL) of suspension with isolated mitochondria containing 0.5 mg protein was treated with trichloroacetic acid (final concentration 0.5 M) and centrifuged at 20,000 *g* for 5 min at 4°C. Supernatants were neutralized with 1.5 volumes of 0.5 M tri-*N*-octylamine in Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane) and centrifuged for 10 min at 10,000 *g* at 4°C. Half the aqueous upper phase was recovered, dried under speed vacuum centrifugation at room temperature, and stored at –80°C until measurement. For dNTP quantification, dry dNTP extracts were thawed and dissolved in 40  $\mu$ L of 40 mM Tris-HCl (pH 7.4) (final equivalent protein concentration, 12.5  $\mu$ g/ $\mu$ L). For dATP and dTTP determination, non-diluted and 1:3 diluted samples were used. For dGTP and dCTP measurement, 1:5 and 1:10 dilutions were required. Duplicates of each sample were assessed. dNTP content was determined using the previously described polymerase-based method<sup>6</sup> with minor modifications. Briefly, 10  $\mu$ L of reaction mixture containing 5  $\mu$ L of dNTP extract, 40 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiothreitol, 0.25  $\mu$ M oligoprimer, 0.75  $\mu$ M [8-<sup>3</sup>H] dATP, 12–21 Ci/mmol (or [methyl-<sup>3</sup>H] dTTP for the dATP assay), and 0.025 U/ $\mu$ L of Sequencing Taq DNA Polymerase (Bioron) was incubated for 1 hour at 48°C. Reaction mixtures with 40 mM Tris-HCl (pH 7.4) dNTP standards were processed in triplicate in parallel. After incubation, 9  $\mu$ L of the mixture was spotted on a 96-position DEAE filtermat (Perkin Elmer) and left to air dry. Filters were washed 6 times with 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, once with water, and once with 70% ethanol, and left to dry again. The retained radioactivity was determined by scintillation counting in a 1450 MicroBeta TriLux detector (Perkin Elmer) after incubating the dry filtermats with MetiLex solid melt-on scintillator (Perkin Elmer) at 80°C. dNTP amounts were calculated from interpolation on calibration curves. dTTP concentrations below 0.8 pmol/mg protein were undetectable and considered as zero. dATP could not be determined because values always fell below the lower limit of quantification.

### Vector and mtDNA copy number and mRNA quantification

DNA was isolated from frozen liver samples by phenol–chloroform extraction, dissolved in 10 mM

Tris-HCl (pH 8) and quantified by spectrophotometry (NanoDrop Spectrophotometer, Thermo Scientific). Detection and quantification of vector and mtDNA copy number was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) using an ABI PRISM 7900HT sequence detector (Applied Biosystems). For hcTYMP DNA copy number quantification, we used the predesigned TaqMan MGB expression assay Hs00157317\_m1 (Applied Biosystems) referred to the murine single-copy nuclear gene *Ang1* predesigned TaqMan MGB gene expression assay Mm00833184\_s1 (Applied Biosystems). Similarly, mtDNA content was measured using an MGB *16S* custom-designed TaqMan probe (FAM-5' AAGTCCTACGTGATCTGAGGT 3'-MGB) and primers (16S Forward: AATGGTTCGTTGTTCAACGATT and 16S Reverse: AGAAACCGACTGGATTGCTC) and referred to the same murine single-copy nuclear gene *Ang1*. In all cases, quantifications were obtained by interpolation on standard curves of several dilutions of plasmids containing hcTYMP DNA or a specific region of the *Ang1* or *16S* genes.

For mRNA quantification, total RNA was extracted from 20–30 mg of ground tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and quantified by spectrophotometry (NanoDrop Spectrophotometer, Thermo Scientific). One  $\mu\text{g}$  of isolated RNA was treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen). Reverse transcription was performed on DNA-free RNA using the High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The resulting cDNA was used for qPCR analysis using the probe indicated above for hcTYMP and referred to *Ppia* mRNA (TaqMan Gene Expression Assay Mm02342430\_g1).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.). Nonparametric tests were used in most comparisons because of the limited number of cases per group ( $n < 10$ ). For comparisons between groups with a larger number of cases, parametric tests were used when data were compatible with a normal distribution. The tests used in each particular case are indicated in the figure legends. For statistical purposes, undetectable values were considered as zero.

## RESULTS

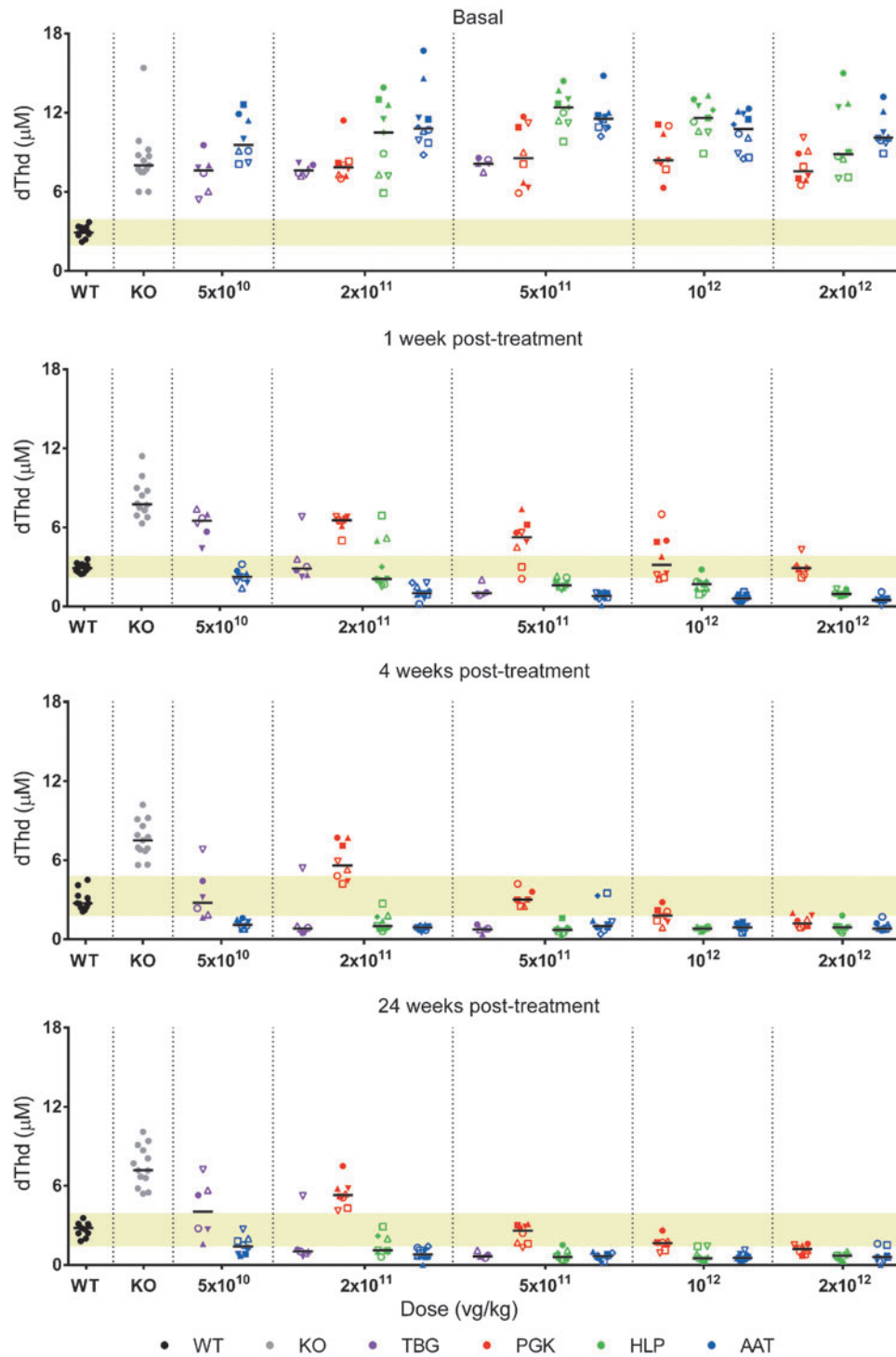
### AAV-AAT was the most effective vector among all tested

Our previous work showed that a single intravenous injection of single-stranded AAV8 vector

carrying the human *TYMP* coding sequence (hcTYMP), transcriptionally targeted to liver under control of the thyroxine-binding globulin promoter (AAV-TBG), reduces the systemic nucleoside overload in a mouse model of MNGIE.<sup>23,24</sup> Here, we compared the efficacy of this AAV-TBG vector with 3 alternative AAV8 vectors containing the same hcTYMP sequence under the control of different promoters and with different DNA configurations: AAV-PGK, with the constitutive phosphoglycerate kinase promoter and single-stranded DNA; scAAV-HLP, with the previously described hybrid liver-specific promoter<sup>31</sup> and self-complementary DNA; and AAV-AAT, with the  $\alpha$ -1-antitrypsin liver-specific promoter and apolipoprotein E hepatocyte control region enhancer<sup>32</sup> and single-stranded DNA (Fig. 1). The HLP and AAT promoters are similar, consisting of a core enhancer from the human apolipoprotein hepatic control region, upstream of the  $\alpha$ -1-antitrypsin gene promoter. However, in the case of HLP, a modified reduced sequence was used to overcome the size limitation of self-complementary vectors.

All results obtained here with AAV-PGK, scAAV-HLP, and AAV-AAT were compared with those obtained previously using the AAV-TBG vector in the same mouse model.<sup>23</sup> In order to accurately compare the results, the reported AAV-TBG doses were recalculated and corrected here according to the titers obtained with a picogreen dsDNA quantification method.<sup>28</sup> This technique, used for all vectors in this study, differs from the methods used for vector quantification in the original report (dot-blot and qPCR).<sup>23</sup> The vector genome re-assessment with the new method revealed that the titers had been significantly overestimated (4 $\times$ ) in the original report due to high amounts of nonencapsidated DNA. For this reason, the doses of AAV-TBG vector quoted here are 4-fold lower than those originally reported.<sup>23</sup> In all cases, we treated 8- to 12-week-old double KO *Tymp*<sup>-/-</sup>/*Upp1*<sup>-/-</sup> male mice<sup>4</sup> with a single intravenous tail injection of the described vectors at several doses, ranging from  $5 \times 10^{10}$  to  $2 \times 10^{12}$  vg/kg.

Plasma nucleoside concentration was monitored over 34 weeks following treatment to investigate treatment efficacy with the different vectors. The results for plasma dThd are shown in Fig. 2, and similar results were obtained for dUrd. The lowest dose of all vectors that reduced dThd to wt levels at some point during the monitoring period was  $5 \times 10^{11}$  vg/kg (Fig. 2 and Supplementary Fig. S1). At lower doses, AAV-PGK failed to reduce dThd to wt levels at any point over the period monitored. The most effective vector in terms of reducing plasma nucleoside concentration was AAV-AAT,



**Figure 2.** Plasma thymidine (dThd) concentration. Plasma dThd concentration in the various groups of mice during the monitoring period. The number of animals (*n*) in each treatment group is 8–10 except for the previously described TBG vector: (*n*=5-6), wt (*n*=11), and KO (*n*=13); where wt and KO correspond to age-matched, untreated wild-type and double knock-out *Tymp*<sup>-/-</sup>/*Upp1*<sup>-/-</sup> mice, respectively. The yellow area corresponds to the wt concentration range. Different dose groups are separated by vertical dotted lines. Horizontal short black lines indicate the median. At the last time point (24 weeks after vector administration), dThd levels were significantly lower than those of KO (*p*<0.01) in all groups except for the 5 × 10<sup>10</sup> TBG and 2 × 10<sup>11</sup> PGK groups (Mann–Whitney test).

which, at the lowest dose tested ( $5 \times 10^{10}$  vg/kg), brought dThd down to wt levels at 1 week post-treatment in all mice, and maintained the concentration at wt levels or below over the entire period monitored. scAAV-HLP, which had a similar promoter in a self-complementary configuration, achieved the same nucleoside reduction at 4 weeks after treatment with a dose of  $2 \times 10^{11}$  vg/kg, suggesting that the self-complementary configuration does not accelerate *TYMP* transgene expression. At the time mice were killed (34 weeks after treatment administration), plasma dThd was at wt level or below in 65% of animals treated with AAV-PGK, 83% of those treated with AAV-TBG, 94% of those treated with scAAV-HLP, and 97% of those treated with AAV-AAT (Supplementary Fig. S1). These results indicate that in comparison with the previously described AAV-TBG vector, a more potent and faster effect on plasma nucleoside reduction is obtained with the AAV-AAT vector.

To assess whether the vectors restored nucleoside homeostasis in tissue, we determined dThd and dUrd concentrations in liver and other commonly affected tissues in MNGIE patients (brain, skeletal muscle, and small intestine) at completion of the monitoring time (Figs. 3d and 4b). Dose-dependent nucleoside reductions to wt levels were observed in liver, brain, and skeletal muscle, with varying efficacy, depending on the vector. As was observed in blood, the most pronounced effect was obtained with AAV-AAT. In small intestine, significant dThd and dUrd reductions only occurred with scAAV-HLP and AAV-AAT ( $p < 0.01$  for all doses, Mann-Whitney test, except for the lowest scAAV-HLP dose,  $2 \times 10^{11}$  vg/kg). In agreement with the plasma findings, liver-specific promoters were more effective than the constitutive PGK promoter in tissues.

#### Transduction and *TYMP* expression were virtually restricted to liver with all vectors tested

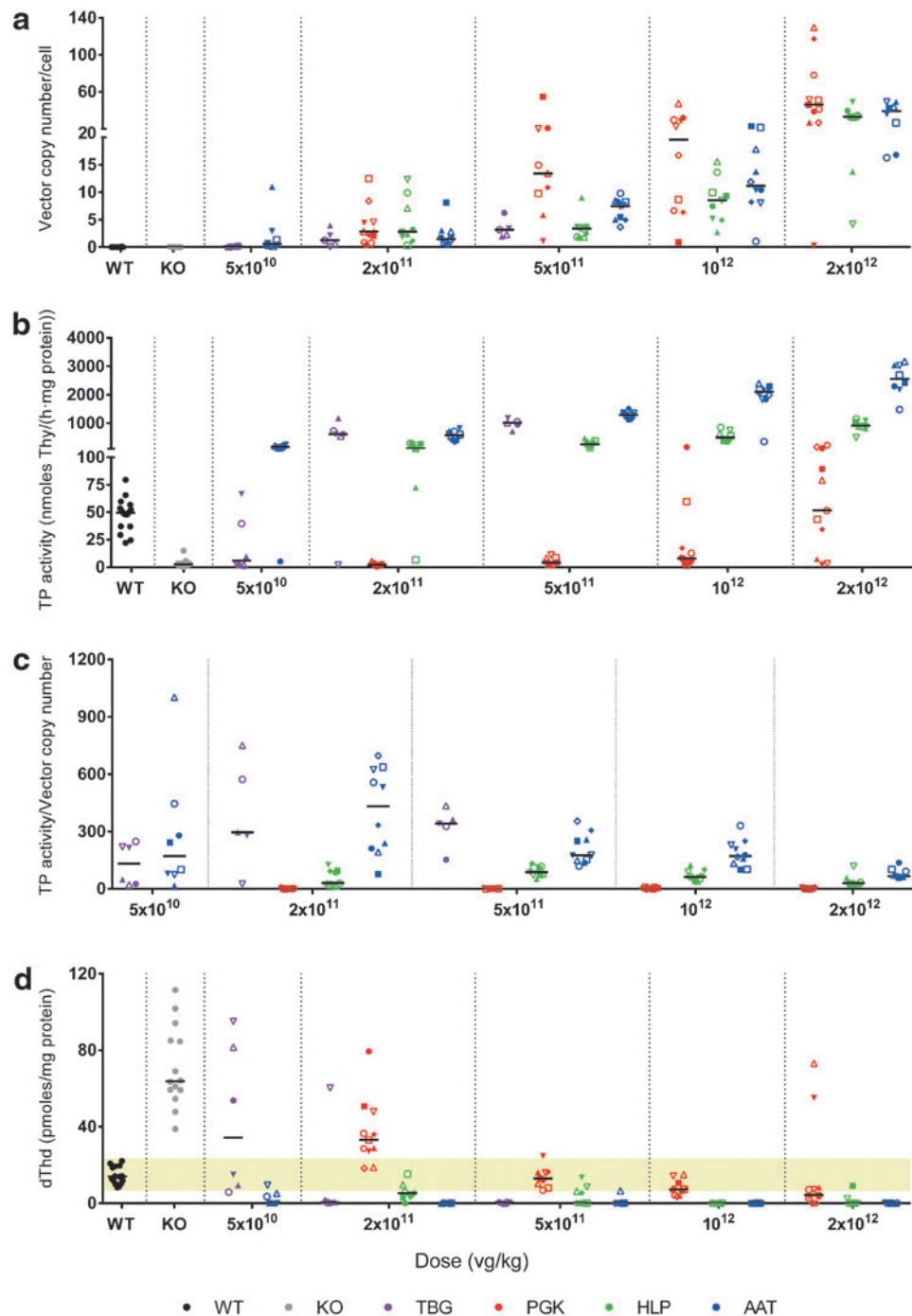
Eight months after treatment, hcTYMP DNA copy number was assessed by quantitative real-time PCR in DNA extracted from liver, brain, skeletal muscle, and small intestine, but was only detectable in liver (Fig. 3a), thus indicating poor transduction efficiency in the other tissues. *TYMP* expression was studied by determining TP enzyme activity (Figs. 3b and 4a) and TP protein levels using Western blot (Supplementary Fig. S2) and immunostaining (Supplementary Fig. S3).

As was expected, a clear correlation was observed in liver between the vector genome copy number per cell and the administered dose in all cases:  $r_{(\text{AAV-TBG})} = 0.9548$ ,  $r_{(\text{AAV-PGK})} = 0.6598$ ,  $r_{(\text{scAAV-HLP})} = 0.7880$ ,  $r_{(\text{AAV-AAT})} = 0.9596$  ( $p < 0.0001$  for all vectors,

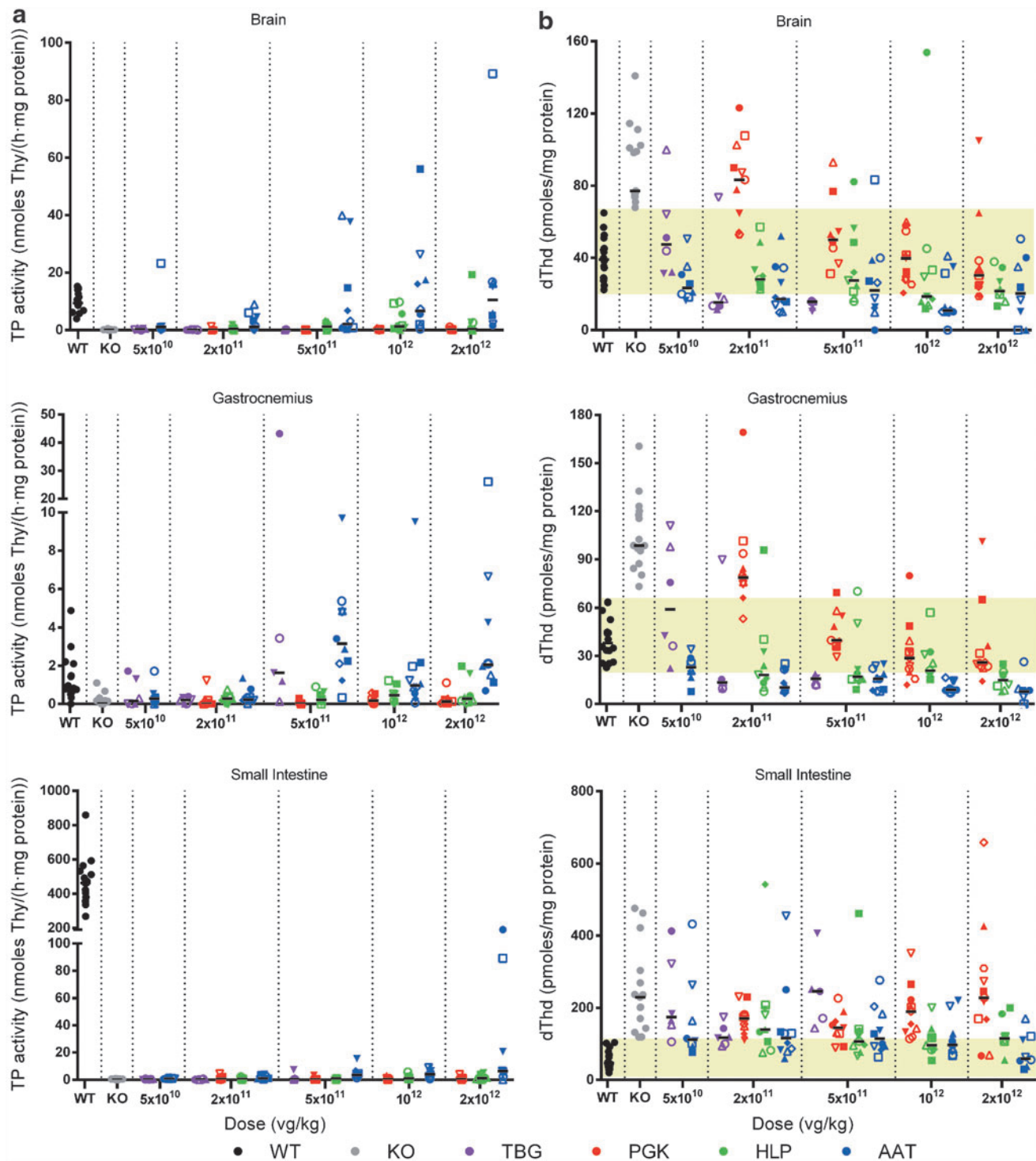
Pearson correlation test). The copy number values obtained here were higher than those we previously reported,<sup>23,24</sup> probably due to differences in the calibration curve slopes or other experimental conditions in different settings. The results showed wide interindividual variation at each dose; sampling bias could account, at least in part, for such variability, since the distribution of the vector in liver is not homogeneous, especially for low doses (Supplementary Fig. S3). Nonetheless, the copy number of all vectors per cell was within the same range for each dose (with a slight, non-significant trend towards higher copy number for AAV-PGK and lower copy number for AAV-TBG).

*TYMP* expression was dependent on the promoter used rather than the vector genome copy number in liver. In treated animals, liver TP activity increased in a dose-dependent manner (Fig. 3b), and Western blot and immunohistochemical analyses results were consistent with the enzyme activities (Supplementary Figs. S2a and S3). The immunostaining images revealed a patchy distribution of the expression for low doses, while a more homogeneous distribution is seen for higher doses, for all vectors. At doses of  $2 \times 10^{11}$  vg/kg and higher, AAV-TBG and AAV-AAT showed similar efficacy in providing TP activity to the liver, which reached values 60-fold higher than wt levels at the highest vector doses. The efficacy of scAAV-HLP was slightly lower, and AAV-PGK, despite being the vector with the highest copy number, was clearly less effective: AAV-PGK restored TP activity to values similar to those in wt mice only at the highest dose ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg). The results obtained at the lowest dose ( $5 \times 10^{10}$  vg/kg) confirmed that AAV-AAT was more effective than AAV-TBG ( $p < 0.005$ , Mann-Whitney test): 7 of 8 animals treated with AAV-AAT showed above-normal liver TP activity, whereas only 2 of 6 animals treated with the AAV-TBG vector reached TP activities within the wt range.

When TP activity was normalized by vector copy number, the distribution of the ratios revealed that AAT and TBG are stronger promoters than HLP and PGK, but there was no evidence that AAT is stronger than TBG (Fig. 3c). In any case, blood dThd levels at the end of the study were, at the lowest vector dose, lower for the AAV-AAT vector compared with the AAV-TBG vector, similarly to what was observed in the *in vivo* monitoring (Fig. 1). Despite the high TP activity provided by the different vectors in liver tissue, especially the AAV-AAT vector, only small to moderate transient elevations of circulating alanine aminotransferase (ALT) above levels of untreated animals were detected in a few mice, indicating that the treatment



**Figure 3.** Biochemical and molecular results in liver 34 weeks after treatment. **(a)** AAV vector genome copy number. Human hcTYMP DNA copy number was assessed by qPCR and referred to the murine single-copy gene *Ang1*. Results for all groups were significantly higher from those of KO ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test). **(b)** Thymidine phosphorylase (TP) activity in liver extracts. Results for all groups except  $5 \times 10^{10}$  TBG and  $2 \times 10^{11}$  PGK were significantly higher from those of KO ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test) **(c)** TP activities normalized per vector genome copy number. Results were significantly higher in animals treated with the AAT vector when comparing with PGK and HLP groups ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test). However, significant differences were not detected between AAT and TBG groups at none of the tested doses. **(d)** Liver dThd concentration. *Yellow area* corresponds to the age-matched wt concentration range. Results for all groups except  $5 \times 10^{10}$  TBG and  $2 \times 10^{11}$  PGK were significantly lower than those of KO ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney test). In all panels,  $n = 8-11$  in each group except TBG ( $n = 5-6$ ), wt ( $n = 8-16$ ), and KO ( $n = 7-17$ ). Different dose groups are separated by vertical dotted lines. Horizontal short black lines indicate the median.



**Figure 4.** TP activity and dThd concentration in different tissues. **(a)** TP activity measured in brain, gastrocnemius muscle, and small intestine 34 weeks after treatment. Using the Mann–Whitney test, the wt, HLP, and AAT groups showed significant differences relative to KO in brain ( $p < 0.01$ ). In gastrocnemius and small intestine, all groups treated with TBG, HLP, and AAT at doses higher than  $5 \times 10^{11}$  vg/kg showed significant differences compared with KO ( $p < 0.05$ ); the PGK groups showed no differences relative to KO in any case. **(b)** dThd concentration in brain, gastrocnemius, and small intestine at the end of the treatment. The yellow area corresponds to the age-matched wt concentration range. Excluding animals treated with  $5 \times 10^{10}$  TBG and  $2 \times 10^{11}$  PGK, all groups showed significant differences relative to KO in both brain and gastrocnemius ( $p < 0.01$ , Mann–Whitney test). In the case of the small intestine, only results from the HLP (except lowest dose) and AAT groups differed significantly from those of KO ( $p < 0.05$ , Mann–Whitney test). Different dose groups are separated by vertical dotted lines. In both panels,  $N = 8–11$  for each group except for TBG ( $n = 5–6$ ), wt ( $n = 15–16$ ), and KO ( $n = 14–17$ ), and horizontal short black lines indicate the median.



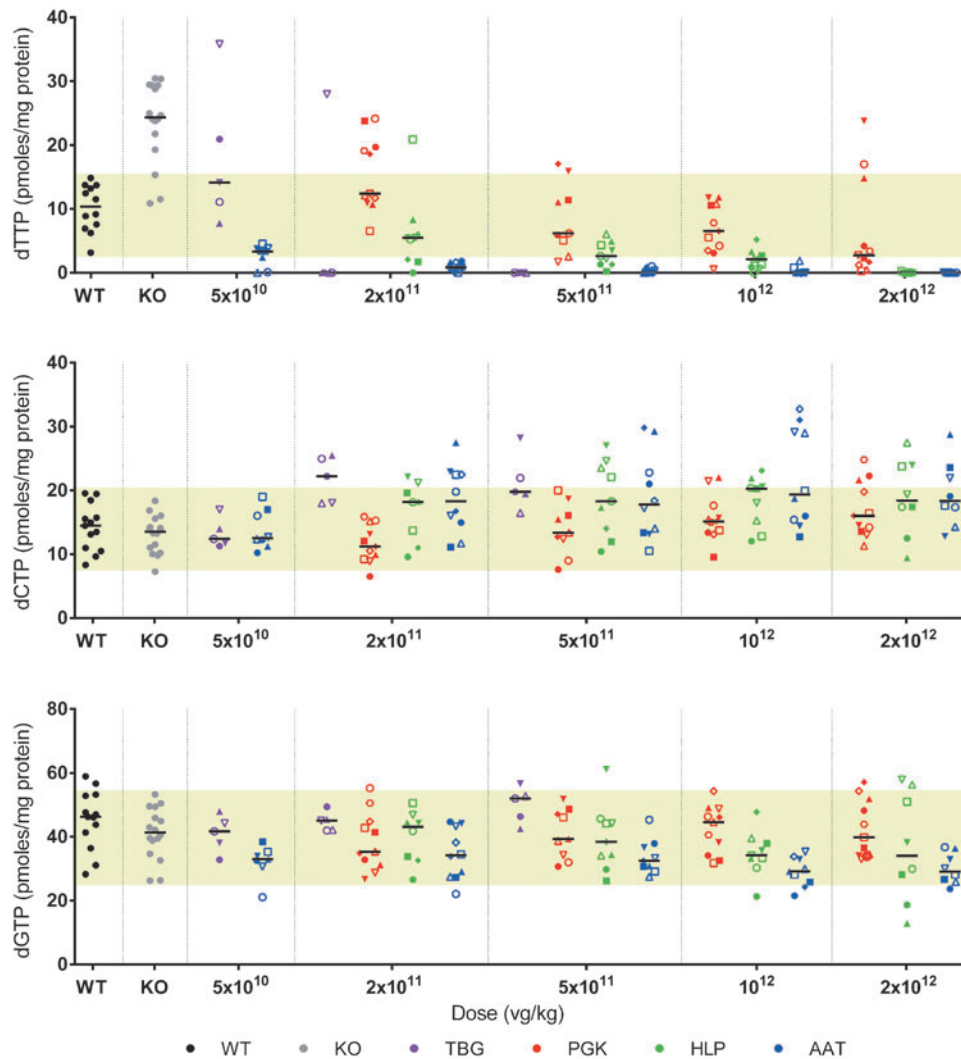
was not associated with hepatotoxicity (Supplementary Fig. S4).

Of note, the product of the transgene was detected in tissues other than liver (despite undetectable hcTYMP DNA) in some mice treated with vectors carrying liver-specific promoters. This contrasts with the lack of effect of the constitutive PGK promoter, which did not lead to TP activity above the levels in untreated mice in non-hepatic tissues (Fig. 4a and Supplementary Fig. S2b).

### The treatment restores mitochondrial dNTP homeostasis in liver

In MNGIE, nucleoside overload causes a dNTP imbalance that ultimately interferes with proper

mtDNA replication. Untreated double KO mice showed expanded dTTP levels in liver mitochondria, as compared to levels in age-matched wt counterparts ( $p < 0.0001$ , Student's *t*-test). After treatment, dTTP increase was prevented, paralleling the dThd reductions observed in liver (Fig. 5). Although dCTP levels were not significantly low in untreated double KO mice, treatment with all vectors induced a slight but significant increase in liver dCTP, except at the lowest dose ( $p < 0.05$ , Mann–Whitney test). Finally, the slight changes observed in the dGTP pool are unlikely to be physiologically relevant, as dGTP remained within the normal range in most treated animals with all doses tested.



**Figure 5.** Mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate pools in liver. Thymidine triphosphate (dTTP) was significantly higher in the KO group than in wt mice ( $p < 0.0001$ , Student's *t*-test). Treatment significantly decreased dTTP levels in all groups ( $p < 0.01$ , Mann–Whitney's test) except for TBG at the  $5 \times 10^{10}$  vg/kg dose. The treatment slightly but significantly increased dCTP levels in all groups except for the TBG, HLP, and AAT promoters at the lowest dose ( $p < 0.05$ , Mann–Whitney test). dGTP was slightly but significantly lower in all groups treated with the AAT promoter (except the  $2 \times 10^{11}$  vg/kg dose,  $p < 0.05$ , Mann–Whitney test), but was increased in mice treated with the TBG promoter at  $5 \times 10^{10}$  vg/kg ( $p = 0.03$ , Mann–Whitney test). In all panels,  $n = 8–11$  for each group except for TBG ( $n = 5$ ), wt ( $n = 12–13$ ), and KO ( $n = 16$ ). Different dose groups are separated by vertical dotted lines. Yellow area corresponds to the wt concentration range, and horizontal short black lines indicate the median.

It should be mentioned that although the double KO mouse is a good biochemical model that recapitulates the biochemical imbalances observed in patients, it does not reproduce other molecular and clinical features, such as mtDNA depletion.<sup>4</sup> We did not find mtDNA depletion in liver and, consistently, no effect of the treatment on this parameter was detected (Supplementary Fig. S5).

## DISCUSSION

Several experimental approaches developed in the past few years have indicated that gene therapy is feasible for treating MNGIE through use of an integrative lentiviral vector targeting hematopoietic progenitors<sup>20,21,33</sup> or an AAV8 vector transcriptionally targeted to liver.<sup>23,24</sup> These strategies were developed to provide an alternative to the currently available treatment options, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation<sup>14–16</sup> and orthotopic liver transplantation,<sup>17,18</sup> which are associated with significant risks and difficulties, such as the need to find compatible donors.

Here, we attempted to improve the gene therapy strategy based on AAV vectors. We focused on these vectors because they show very low rates of integration into the host genome (relative to lentiviral vectors), and because similar AAV-based strategies have yielded good results in clinical studies.<sup>34–36</sup> As AAV-mediated *TYMP* expression has proven effective for clearing systemic accumulation of dThd and dUrd nucleosides causing MNGIE,<sup>23,24</sup> the next effort in this line would be to minimize the vector dose required for safety reasons. AAV administration can lead to the development of a detrimental immune response associated with short-lived transgene expression, as reported in some preclinical and clinical studies.<sup>25,35,37–39</sup> An effective strategy to mitigate AAV vector immunogenicity in clinical practice has been reduction of the therapeutic dose via expression cassette optimization.<sup>34</sup> Additionally, smaller doses would lower the risk of vector insertion in the host genome and genotoxicity.<sup>40</sup> Dose reduction responds to economic considerations as well, as AAV manufacturing costs are high.

It is important to note that the predicted transduction efficiency of AAV in human liver is expected to be lower than that in mice,<sup>41,42</sup> which further supports the need to improve the biochemical efficacy of the vector. This difference between mice and humans should also be considered in relation to potential safety issues, because it suggests that the biochemical overcorrection observed in the treated murine model (dThd and

dTTP levels below normal values) is not expected to occur in humans, as is discussed below.

Our results indicate that AAV-AAT is the most effective vector among those tested in this study, significantly improving the results of the previously reported AAV-TBG vector.<sup>23,24</sup> Use of the AAT promoter led to the highest TP activity in liver of treated mice and the fastest and most marked reductions in dThd and dUrd levels in blood and tissues. One week after treatment administration, AAV-AAT was the only vector that achieved normalized blood nucleoside levels at the lowest dose tested ( $5 \times 10^{10}$  vg/kg), a considerable improvement in efficacy over that of the AAV-TBG vector.<sup>23</sup> However, when TP activity results are normalized by the vector genome copy number, the results support that AAT is more effective than PGK and HLP as a promoter, but there is no evidence that AAT is stronger than TBG. It should be noted that the wide dispersion of the TP activity/copy number ratios make these values very imprecise as estimates of the promoter strengths. In addition, for AAT, TBG, and HLP promoters, these ratios decrease at higher doses (which correspond to higher vector copy numbers), suggesting that the efficiency of the transgene expression is lower for higher vector copy numbers. Other groups have reported similar observations, which could be related with the saturation of the expression machinery or with epigenetic factors such as repeat-induced gene silencing.<sup>31,36</sup> Overall, the results do not allow us to conclude that the improved results observed for the AAV-AAT vector versus the AAV-TBG vector are due to a better efficacy of the AAT promoter.

Interestingly, the scAAV-HLP vector, which also acts under control of the alpha-1-antitrypsin promoter, did not provide better results than the single-stranded AAV-AAT vector, suggesting that the self-complementary configuration did not offer any advantages for transgene expression or function. This observation should be interpreted taking into account that the HLP promoter is a modified (smaller) version of the AAT promoter<sup>31</sup> due to the size restrictions of the self-complementary vector. Also due to size limitations, the scAAV-HLP vector does not contain intron sequences, which are reported to contribute to mRNA protection and stability.<sup>43</sup> The self-complementary configuration favors faster expression of the transgene because scAAV vectors do not depend on cell replication machinery for their expression and are reported to be more stable and persistent within the host cell,<sup>44</sup> but the positive effect depends on the specific transgene used in each case.<sup>45</sup> In addition, systemic



administration of scAAV vectors is known to enhance both the innate and adaptive immune response in a dose-dependent manner.<sup>37,46</sup> In agreement with this concept, we found that the dose-dependency of the effect of the scAAV-HLP vector was weaker than that of AAV-AAT, especially when TP activity in liver was examined. Taken together, these findings discourage use of the self-complementary configuration for a proposed AAV vector for MNGIE treatment.

In addition to increased effectiveness, selection of a specific enhancer/promoter sequence has an influence on the incidence of malignancies after AAV gene delivery. In a recent study, AAT and TBG promoters both induced AAV integration in the *Rian* locus in mice, but use of the AAT enhancer/promoter did not lead to overexpression of local genes, unlike the TBG promoter.<sup>40</sup> It is worth mentioning that *TYMP* can act as a suicide gene in *TYMP*-expressing tumors when capecitabine is used, as the TP enzyme is needed to activate this prodrug; this would be an additional safety mechanism for treated patients.<sup>47</sup>

Use of the PGK promoter did not succeed in providing TP activity to organs other than liver. The main reason why we tested a constitutive promoter was to achieve transgene expression in many different tissues to evaluate dose reductions. PGK was expected to induce *TYMP* expression in tissues where AAV8 is efficiently transduced. AAV8 serotype has been reported to transduce tissues such as heart, skeletal muscle, and brain, although less efficiently in these tissues than in liver.<sup>48</sup> Therefore, we expected the AAV-PGK vector to induce transgene expression in tissues other than liver, thereby contributing to systemic nucleoside clearance. However, the AAV-PGK vector did not provide TP activity to nonhepatic tissues, which is consistent with the failure to detect hcTYMP DNA in these tissues. This result agrees with the findings of a study in which genome copies in liver were  $\geq 3$  log greater than the values in other tissues after AAV8-mediated transduction.<sup>48</sup> Furthermore, the performance of AAV-PGK in liver was the poorest of all the vectors tested, in agreement with the fact that AAT and TBG are liver-specific promoters and more effective in this organ than the constitutive PGK promoter.

Interestingly, slight or moderate elevations of TP activity (and TP protein detected by Western blot) were observed in brain, skeletal muscle, and small intestine of some mice treated with vectors having liver-specific promoters, especially AAV-AAT at high vector doses. Since hcTYMP DNA copy number was undetectable in these tissues, we tes-

ted different DNA extraction methods in an attempt to maximize the yield of extraction for episomal DNA. Nonetheless, we were only able to detect hcTYMP DNA in few of these TP-positive samples by either qPCR or conventional PCR (data not shown). Similar negative results were obtained when we measured *TYMP* mRNA by qPCR in nonhepatic tissues with the highest TP activities in AAV-AAT treated mice, (i.e., RNA levels were undetectable in most samples and barely detectable [negligible] in few isolated cases [data not shown]). As increased TP activity must be derived from expression of the transgene in effectively transduced cells, we have to assume that the methods we used to detect TP protein and activity are more sensitive than those used to detect hcTYMP DNA. Illegitimate expression of such promoters has been reported; endogenous  $\alpha$ -1-antitrypsin transcription is most abundant in liver cells, but it also occurs in a variety of other tissues, such as kidney, gastrointestinal tract (stomach and small intestine), pancreas, brain, adrenal glands, testes, blood monocytes, and tissue-specific macrophages.<sup>49–51</sup> Alternatively, the presence of TP protein in these nonhepatic tissues could be derived from exosomal export from liver, either as mRNA or protein. In fact, TP protein has been found in exosomes derived from nasopharyngeal carcinoma cells, platelets and thymus.<sup>52</sup> Our observations also support that the liver-specific TBG and AAT promoters we used would be more powerful in these tissues than the PGK constitutive promoter.

In MNGIE, dThd accumulation causes a dNTP imbalance, which is the direct biochemical interference mechanism impairing mtDNA replication.<sup>5,6,53</sup> The results from the present study confirm that systemic dThd reduction lowers the mitochondrial dTTP content, as was observed in our previous studies.<sup>21,24</sup> The high TP activity achieved in liver, well above the normal values in mice, led to systemic dThd levels even below normal values, and the resulting mitochondrial dTTP levels in liver were also excessively reduced. The same effect has been reported in a long-term study of the AAV-TBG vector.<sup>24</sup> This observation may raise some concerns because of the risk of malignancies or other undesired effects on nuclear or mitochondrial DNA. There were no cases of hepatocarcinoma in the present study (mice killed at age 10 months) and our previous long-term AAV-TBG study did not show an increased incidence of liver tumors in animals treated with either dose and killed at 21 months of age.<sup>24</sup> Other factors support the notion that the risk of excessive reductions in humans is lower than that in mice.

First, normal dThd and dUrd levels in humans are below the lower limit of detection of commonly used methods for nucleoside assessment ( $0.05 \mu\text{mol/L}$  in our study<sup>12</sup>). This means that levels reached in mice after treatment, although they are below normal murine values, are still above normal human values. Second, while nucleoside levels show a 20- to 500-fold increase in MNGIE patients,<sup>54</sup> the murine disease model exhibits moderate increases (only around 4-fold). Therefore, it is expected that the quantitative effect of treatment on nucleoside levels would be less pronounced in patients than in mice. Third, TP activities in mice treated with high vector doses were well above normal murine levels (25–75 nmol/h/mg prot) but were within the normal or only slightly higher than normal TP activity range in humans (1800–2000 nmol/h/mg prot<sup>30</sup>). Finally, AAV transduction is reported to be around 20-fold higher in murine liver than in human hepatocytes,<sup>41,42</sup> which implies that the doses tested in this study are likely to promote lower TP activities in liver of MNGIE patients than those observed in mice. Taken together, these considerations point out relevant differences in nucleoside metabolism and AAV treatment response between mice and humans and suggest that the dThd excessive reduction and dTTP depletion observed in mice will not occur in humans.

In this study, all vectors tested restored TP activity in liver and reduced systemic nucleoside overload, but the construct including single-stranded DNA and the *TYMP* transgene under control of the AAT promoter was the most effective.

These results further support the feasibility of using an AAV vector transcriptionally targeted to the liver as therapy for MNGIE, and provide evidence that the previously tested vector<sup>23,24</sup> can be improved if the transgene is under control of the AAT promoter. This strategy should be considered for clinical use in MNGIE, a severe disorder with limited treatment options.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded in part by the Spanish *Instituto de Salud Carlos III* (grant PI15/00465 to R.M., co-funded with E.R.D.F.). Raquel Cabrera was partially funded by a fellowship granted by the Vall d'Hebron Institut de Recerca. JT was funded by a fellowship granted by the *Generalitat de Catalunya* (PERIS program, SLT002/16/00370). We thank Dr. Natwani (University College London Cancer Institute, London), for kindly sharing the pAV-HLP-Luc plasmid used for construction of the scAAV-HLP vector.

## AUTHOR DISCLOSURE

No competing financial interest exist.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure S1  
 Supplementary Figure S2  
 Supplementary Figure S3  
 Supplementary Figure S4  
 Supplementary Figure S5

## REFERENCES

- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283:689–692.
- Garone C, Tadesse S, Hirano M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2011;134:3326–3332.
- Marti R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:14–18.
- Lopez LC, Akman HO, Garcia-Cazorla A, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18:714–722.
- Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, et al. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281:22720–22728.
- Gonzalez-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL, et al. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* 2011;7:e1002035.
- Giordano C, Sebastiani M, Plazzi G, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: Evidence of mitochondrial DNA depletion in the small intestine. *Gastroenterology* 2006;130:893–901.
- Nishigaki Y, Marti R, Copeland WC, et al. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003;111:1913–1921.
- Nishigaki Y, Marti R, Hirano M. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 2004;13:91–101.
- Lara MC, Weiss B, Illa I, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1461–1463.
- Moran NF, Bain MD, Muqit MM, et al. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for MNGIE. *Neurology* 2008;71:686–688.
- Spinazzola A, Marti R, Nishino I, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 2002;277:4128–4133.
- Yavuz H, Ozel A, Christensen M, et al. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch Neurol* 2007;64:435–438.
- Halter JP, Michael W, Schupbach M, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* 2015;138:2847–2858.

15. Hirano M, Marti R, Casali C, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67:1458–1460.
16. Sicurelli F, Carluccio MA, Toraldo F, et al. Clinical and biochemical improvement following HSCT in a patient with MNGIE: 1-year follow-up. *J Neurol* 2012;259:1985–1987.
17. D'Angelo R, Rinaldi R, Pironi L, et al. Liver transplant reverses biochemical imbalance in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Mitochondrion* 2017;34:101–102.
18. De Giorgio R, Pironi L, Rinaldi R, et al. Liver transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Ann Neurol* 2016;80:448–455.
19. Halter J, Schupbach WM, Casali C, et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): A consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:330–337.
20. Torres-Torronteras J, Gomez A, Eixarch H, et al. Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* 2011;18:795–806.
21. Torres-Torronteras J, Cabrera-Perez R, Barba I, et al. Long-term restoration of thymidine phosphorylase function and nucleoside homeostasis using hematopoietic gene therapy in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2016;27:656–667.
22. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415–419.
23. Torres-Torronteras J, Viscomi C, Cabrera-Perez R, et al. Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther* 2014;22:901–907.
24. Torres-Torronteras J, Cabrera-Perez R, Vila-Julia F, et al. Long-term sustained effect of liver-targeted adeno-associated virus gene therapy for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Gene Ther* 2018;29:708–718.
25. Calcedo R, Wilson JM. Humoral Immune Response to AAV. *Frontiers in Immunology* 2013;4:341.
26. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: Overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122:23–36.
27. Rogers GL, Martino AT, Aslanidi GV, et al. Innate immune responses to AAV vectors. *Front Microbiol* 2011;2:194.
28. Piedra J, Ontiveros M, Miravet S, et al. Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther Methods* 2015;26:35–42.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
30. Valentino ML, Marti R, Tadesse S, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett* 2007;581:3410–3414.
31. McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* 2013;121:3335–3344.
32. Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro. *Mol Ther* 2000;1:522–532.
33. Yadak R, Cabrera-Perez R, Torres-Torronteras J, et al. Preclinical efficacy and safety evaluation of hematopoietic stem cell gene therapy in a mouse model of MNGIE. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;8:152–165.
34. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specificity factor IX variant. *N Engl J Med* 2017;377:2215–2227.
35. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994–2004.
36. Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther* 2011;19:876–885.
37. Martino AT, Suzuki M, Markusic DM, et al. The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* 2011;117:6459–6468.
38. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006;12:342–347.
39. Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 2007;13:419–422.
40. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 2015;125:870–880.
41. Lisowski L, Dane AP, Chu K, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature* 2014;506:382–386.
42. Vercauteren K, Hoffman BE, Zolotukhin I, et al. Superior in vivo transduction of human hepatocytes using engineered AAV3 capsid. *Mol Ther* 2016;24:1042–1049.
43. Wu Z, Sun J, Zhang T, et al. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther* 2008;16:280–289.
44. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008;16:1648–1656.
45. Bell P, Wang L, Chen SJ, et al. Effects of self-complementarity, codon optimization, transgene, and dose on liver transduction with AAV8. *Hum Gene Ther Methods* 2016;27:228–237.
46. Wu T, Topfer K, Lin SW, et al. Self-complementary AAVs induce more potent transgene product-specific immune responses compared to a single-stranded genome. *Mol Ther* 2012;20:572–579.
47. Lopez-Esteviz S, Ferrer G, Torres-Torronteras J, et al. Thymidine phosphorylase is both a therapeutic and a suicide gene in a murine model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Gene Ther* 2014;21:673–681.
48. Chen SJ, Sanmiguel J, Lock M, et al. Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2013;24:154–160.
49. Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, et al. Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest* 1988;82:26–36.
50. Kelsey GD, Povey S, Bygrave AE, et al. Species- and tissue-specific expression of human alpha 1-antitrypsin in transgenic mice. *Genes Dev* 1987;1:161–171.
51. Sifers RN, Carlson JA, Clift SM, et al. Tissue specific expression of the human alpha-1-antitrypsin gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 1987;15:1459–1475.
52. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 2012;1.
53. Ferraro P, Pontarin G, Crocco L, et al. Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Biol Chem* 2005;280:24472–24480.
54. Marti R, Spinazzola A, Tadesse S, et al. Definitive diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays. *Clin Chem* 2004;50:120–124.

Received for publication October 24, 2018;  
accepted after revision March 11, 2019.

Published online: March 21, 2019.