



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE VETERINÀRIA**

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

**UNA NOVA APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA
PER AL TRACTAMENT DE LES MALALTIES DE
SANDHOFF I TAY-SACHS**

GEMMA ELIAS BOSCH

La present tesi doctoral del programa de doctorat Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina s'ha dut a terme sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert i la Dra. Sara Marcó Costa i la tutorització de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

GEMMA ELIAS BOSCH

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

SARA MARCÓ COSTA

SETEMBRE 2022

BELLATERRA

A la meva família

Després de molts anys i de moltes experiències, sembla que ja arriba el final d'aquesta etapa. D'aquests anys emporto molt bons records, tot i que no sempre ha estat fàcil, m'han permès créixer i formar-me en molts sentits. En al CBATEG hi he trobat una gran família, sense la qual no hagués pogut arribar on soc ara mateix. Per aquest motiu agraeixo moltíssim la vostra companyia i suport sense els quals aquesta tesi no hagués estat possible, moltes gràcies a tots.

Especialment, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch per haver-me donat l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral al teu grup d'investigació. Moltíssimes gràcies per tot l'esforç i l'entusiasme dedicat tant a mi com al projecte, que m'ha permès aprendre molt i formar-me com a científica.

Moltes gràcies també a la meva codirectora, la Sara. Gràcies pels consells i per la confiança que he rebut de part teva durant tots aquests anys, he après molt al teu costat. Gràcies per ser-hi quan ho necessitava i per la motivació per continuar endavant.

També m'agradaria donar les gràcies a la meva família i els meus amics. Gràcies per ser-hi sempre, pel vostre suport i la vostra confiança amb mi, fins i tot quan ni jo mateixa la tenia. Sense vosaltres no hagués arribat fins aquí.

Aquesta tesi ha estat possible gràcies a l'ajut per contractar personal investigador novell (FI, 2019FI-B1 00044) finançat per l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) i Unió Europea Fons Social Europeu. Les investigacions s'han dut a terme gràcies al finançament rebut del Projecte SAF2017-86266-R (finançat per MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ i FEDER *Una manera de hacer Europa*), del Projecte PID2020-113864RB-100 (finançat per MCIN/ AEI /10.13039/501100011033) i de la Generalitat de Catalunya (2017 SGR 01508).

AAV	Virus adenoassociats (<i>Adeno-Associated Virus</i>)
AG	Aparell de Golgi
ATP	Adenosina trifosfat
BCA	Àcid bicinconínic (<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>)
BHE	Barrera hematoencefàlica
bp	Parells de bases (<i>Base Pares</i>)
BSA	Albúmina sèrica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCL3	Lligand de citocina C-C tipus 3 (<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>)
CCL4	Lligand de citocina C-C tipus 4 (<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>)
CD68	Clúster de diferenciació 68 (<i>Cluster of Differentiation 68</i>)
cDNA	DNA complementari
CHOP	Proteïna homologa a la proteïna d'unió al potenciador CCAAT (<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homologous Protein</i>)
CMV	Enhancer del citomegalovirus
CXCL10	Quimiocina C-X-C tipus 10 (<i>C-X-C Motif Chemokine 10</i>)
d	Dia
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMDP	Pirrolidina 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-mannitol
DMMB	<i>1,9-dimethylmethylene blue</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	Desoxinucleòsuid trifosfat
ERT	Teràpia de substitució enzimàtica (<i>Enzyme Replacement Therapy</i>)
FcRγ	Receptor Fc de la cadena γ (<i>Fc Receptor Gamma-Chain</i>)
FDA	<i>Food and drug administration</i>
g	Força g
g	Grams
GA2	Gangliòsid asialo-GM2
GAGs	Glicosaminoglicans
GalCerS	2-hidroxiacilesfingosina 1- β -galactosiltransferasa (<i>2-hydroxyacylsphingosin 1-beta-galactosyltransferase</i>)
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GM2A	Activador del gangliòsid GM2 (<i>GM2 Activator</i>)
GUSB	β -glucuronidasa
h	Hora
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>

HEXA	β -hexosaminidasa isoforma A (subunitats $\alpha\beta$)
HEXB	β -hexosaminidasa isoforma B (subunitats $\beta\beta$)
HEXS	β -hexosaminidasa isoforma S (subunitats $\alpha\alpha$)
HGMD	Base de dades de mutacions genètiques humanes (<i>Human Gene Mutation Database</i>)
HGSNAT	Heparan- α -glucosaminida-N-acetiltransferasa
HIR	Receptor de la insulina humana (<i>Human Insulin Receptor</i>)
HSC	Cèl·lules mare hematopoètiques (<i>Hematopoietic Stem Cell</i>)
HSCT	Trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>)
ICV	Via intratecal o intracerebroventricular
IL-6	Interleucina 6
IRES	Lloc intern d'entrada al ribosoma (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
ITR	Repeticions terminals invertides (<i>Inverted Terminal Repeats</i>)
kb	Kilo parell de bases
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KO	Knock-out
L	Litre
LAMP1	Proteïna lisosòmiques associades a la membrana tipus 1 (<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i>)
LAMP2	Proteïna lisosòmiques associades a la membrana tipus 1 (<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 2</i>)
LC3B	Cadena lleugera 3B de la proteïna associada als microtúbuls 1A/1B (<i>Microtubule-associated Protein 1A/1B Light Chain 3B</i>)
LCR	Líquid cefalorraquidi
LIMP2	Proteïnes lisosòmiques de membrana tipus 2 (<i>Lysosomal Integral Membrane Protein 2</i>)
LMP	Proteïnes de la membrana lisosomal (<i>Lysosomal Membrane Proteins</i>)
LSD	Malalties d'acumulació lisosòmica (<i>Lysosomal Storage Disease</i>)
M6P	Manosa-6-fosfat
mAb	Anticòs monoclonal (<i>Monoclonal Antibody</i>)
MCP1	Proteïna quimioattractant de monòcits tipus 1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>)
mg	Mil·ligram
min	Minut
ml	Mil·lilitre

mM	Mil·limolar
MPS	Mucopolisacaridosi
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MUG	4-metilumbel·liferil-N-acetilglucosaminida
MUGS	4-metilumbel·liferil-N-acetilglucosaminida-6-sulfat
NAGLU	N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa
NB-DNJ	N-butildesoxinojirimicina
ng	Nanogram
nm	Nanòmetre
o/n	<i>Over Night</i>
°C	Graus cèlsius
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
ORF	Marc oberts de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
p	Valor p
p/v	Pes/Volum
PBS	Tampó fosfat salí (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilè glicol
PERK	Quinasa del reticle endoplasmàtic similar a la proteïna quinasa R (<i>Protein Kinase R-Like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>)
PFA	Paraformaldehid
PGRN	Progranulina
PLP1	Proteolipina 1 (<i>Proteolipid Protein 1</i>)
poliA	Senyal de poliadenilació
PYR	Pirimetamina (<i>Pyrimethamine</i>)
QM	Quilomicró
qPCR	PCR quantitativa
RB	<i>Roller bottles</i>
RE	Reticle endoplasmàtic
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	PCR amb transcriptasa inversa
s	Segon
SEM	Error estàndard de la mitjana (<i>Standard Error Mean</i>)
SGSH	N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa
SNC	Sistema nerviós central

Abreviacions

SPF	Condicions lliures de patògens específics (<i>Specific-Pathogen-Free</i>)
SRT	Teràpia de reducció del substrat (<i>Substrate Reduction Therapy</i>)
ssDNA	DNA de cadena simple
TfR	Transferrina (<i>Transferrin Receptor</i>)
TGF1β	Factor de creixement transformant 1 β (<i>Transforming Growth Factor-β1</i>)
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>)
U	Unitat
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
V	Volt
v/v	volum/volum
vg	Genomes virals (<i>Viral Genomes</i>)
WT	Animals control/sans (<i>Wild-Type</i>)
μg	Microgram
μl	Microlitre
μm	Micròmetre
4MU	4-metilumbeliferona

I. PRESENTACIÓ	1
II. INTRODUCCIÓ	5
1. MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA	7
1.1. <i>Lisosomes i enzims lisosòmics</i>	7
1.2. <i>Malalties d'acumulació lisosòmica</i>	11
2. GANGLIOSIDOSIS GM2	14
2.1. <i>Incidència de les gangliosidosis GM2</i>	15
2.2. <i>El gangliòsid GM2</i>	16
2.2.1. <i>Catabolisme del gangliòsid GM2</i>	17
2.3. <i>Característiques moleculars de les gangliosidosis GM2</i>	20
2.3.1. <i>Gen HEXA, HEXB i GM2A</i>	20
2.3.2. <i>β-Hexosaminidases</i>	20
2.3.2.1. <i>Enzim Hexosaminidasa A (HEXA)</i>	22
2.3.3. <i>Mutacions als gens de la β-hexosaminidasa</i>	23
2.3.5. <i>Correlació genotip-fenotip</i>	26
2.4. <i>Fisiopatologia de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff</i>	32
2.5. <i>Descripció clínica de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff</i>	34
2.5.1. <i>Malalties de Tay-Sachs i Sandhoff infantils</i>	34
2.5.2. <i>Malalties de Tay-Sachs i Sandhoff juvenils</i>	35
2.5.3. <i>Malalties de Tay-Sachs i Sandhoff d'inici tardà</i>	36
2.6. <i>Diagnòstic de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff</i>	37
2.7. <i>Models animals de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff</i>	38
2.7.1. <i>Models murins</i>	38
2.7.2. <i>Model oví de la malaltia de Tay-Sachs</i>	41
2.7.3. <i>Model felí de la malaltia de Sandhoff</i>	41
2.8. <i>Tractament per a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff</i>	42
2.8.1. <i>Tractament simptomàtic</i>	42
2.8.2. <i>Teràpia de reducció del substrat</i>	43

2.8.3. Teràpia de substitució enzimàtica	44
2.8.4. Xaperones farmacològiques.....	45
2.8.5. Trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques	47
3. TERÀPIA GÈNICA.....	49
3.1. <i>Vectors virals adenoassociats</i>	50
3.1.1. Biologia dels virus adenoassociats.....	50
3.1.2. Producció dels vectors AAV recombinants.....	52
3.2. <i>Teràpia gènica per a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff</i>	55
3.2.1. Teràpia gènica basada en l'administració d'un sol vector monocistrònic.....	55
3.2.2. Teràpia gènica basada en la co-administració de dos vectors monocistrònics.....	56
3.2.3. Teràpia gènica basada en l'administració de vectors monocistrònics codificants pels dos gens	57
3.2.4. Teràpia gènica basada en l'administració de vectors bicistrònics per a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff	58
III. OBJECTIUS	61
IV. RESULTATS.....	65
PART 1. CARACTERITZACIÓ DELS MODELS MURINS DE LES MALALTIES DE TAY-SACHS I SANDHOFF	67
1. CARACTERITZACIÓ DEL RATOLÍ MODEL DE LA MALALTIA DE TAY-SACHS	69
1.1. Expressió dels mRNA i anàlisis de les activitats enzimàtiques.....	69
1.2. Supervivència	72
2. CARACTERITZACIÓ DEL RATOLÍ MODEL DE LA MALALTIA DE SANDHOFF	73
2.1. Estudi de la deficiència del gen <i>HexB</i> i els seus efectes en la supervivència.....	73
2.1.1. <i>Expressió dels mRNA i anàlisis de les activitats enzimàtiques.</i>	73
2.1.2. <i>Supervivència</i>	75

2.2. Estudi de la patologia al SNC dels ratolins Sandhoff a una edat primerenca.....	77
2.2.1. Acumulació primària del gangliòsid GM2 a l'encèfal	77
2.2.2. Acumulació secundària del colesterol no esterificat a l'encèfal	78
2.2.3. Homeòstasi lisosòmica	80
2.2.3.1. Distensió lisosòmica.....	80
2.2.3.2. Desregulació enzimàtica	82
2.2.4. Anàlisi de la neuroinflamació: Astrocitosi.....	83
PART 2. DESENVOLUPAMENT D'UNA APROXIMACIÓ DE TERÀPIA GÈNICA PER A LA MALALTIA DE SANDHOFF I TAY-SACHS.....	85
1. DISENY I CONSTRUCCIÓ DELS VECTORS CODIFICANTS PER LES SUBUNITATS α I β DE LA β-HEXOSAMINIDASA UNIDES	87
1.1. Estudi <i>in vitro</i> per determinar l'eficiència dels diferents constructes duals	90
2. OBTENCIÓ DELS VECTORS VIRALS ADENOASSOCIATS DE SEROTIP 9	92
3. ESTUDI IN VIVO PER DETERMINAR EL MILLOR VECTOR AAV9 DUAL PER AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA DE SANDHOFF.....	93
3.1. Estudi de l'activitat enzimàtica al SNC	94
3.2. Reducció de l'acumulació del gangliòsid GM2	97
PART 3. ESTUDI DE L'EFICÀCIA TERAPÈUTICA DELS VECTORS DUALS PER AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA DE SANDHOFF	99
1. DISENY EXPERIMENTAL	101
2. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUALS HEXA-L-HEXB EN LA PATOLOGIA DEL SNC.....	103
2.1. Estudi de l'activitat enzimàtica al SNC	103
2.2. Correcció de l'acumulació primària del gangliòsid GM2	107
2.3. Reducció de l'acumulació secundària del colesterol no esterificat	110
2.4. Recuperació de l'homeòstasi lisosòmica en els animals tractats..	113
2.4.1. Reversió de la distensió lisosòmica	113

2.4.2. Normalització de l'homeòstasi del lisosoma.....	116
2.4.3. Anàlisi de l'autofàgia.....	118
2.5. Correcció de la neuroinflamació.....	119
2.6. Efecte del tractament amb els vectors AAV9 duals sobre la desmielinització	127
3. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUALS A LA PATOLOGIA DELS TEIXITS PERIFÈRICS	129
3.1. Estudi de l'activitat enzimàtica al fetge i al sèrum.....	129
3.2. Correcció de l'acumulació secundària dels GAGs en teixits preifèrics	133
3.3. Correcció de l'acumulació secundària del colesterol	135
3.4. Restauració de l'homeòstasi del lisosoma.....	136
4. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUALS EN LES ALTERACIONS DEL COMPORTAMENT	137
4.1. Anàlisi de l'activitat exploratòria i locomotora	137
4.2. Avaluació de la coordinació.....	140
4.3. Anàlisi de la coordinació i la força muscular.....	142
4.4. Estudi de la mobilitat en els ratolins tractats amb els vectors AAV9 duals.....	142
4.5. Estudi de les anormalitats neurològiques	143
5. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUAL EN LA SUPERVIVÈNCIA	145
PART 4. ESTUDI DE L'EFICÀCIA TERAPÈUTICA DELS VECTORS DUALS PER AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA DE TAY-SACHS	149
1. DISENY EXPERIMENTAL	151
2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA AL SNC.....	152
3. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA AL FETGE I AL SÈRUM ...	155
V.DISCUSSIÓ	157
VI.CONCLUSIONS.....	173
VII. MATERIALS I MÈTODES.....	177

1. MATERIALS	179
1.1. <i>Animals</i>	179
1.2. <i>Soques bacterianes.....</i>	179
1.3. <i>Anticossos.....</i>	180
1.4. <i>Plasmidis.....</i>	180
1.5. <i>Reactius</i>	183
2. MÈTODES	184
2.1. <i>Genotipatge dels ratolins Sandhoff i Tay-Sachs</i>	184
2.1.1. <i>Aïllament del DNA genòmic</i>	184
2.1.2. <i>Genotipatge per PCR.....</i>	184
2.1.2.1. <i>Colònia de ratolins Sandhoff.....</i>	184
2.1.2.2. <i>Colònia de ratolins Tay-Sachs.....</i>	185
2.2. <i>Tècniques de manipulació del DNA.....</i>	187
2.2.1. <i>Preparació del DNA plasmídic</i>	187
2.2.2. <i>Digestió del DNA amb enzims de restricció.....</i>	187
2.2.3. <i>Purificació i resolució del DNA</i>	188
2.2.4. <i>Desfosforilació dels fragments de DNA.....</i>	188
2.2.5. <i>Lligació dels fragments de DNA</i>	189
2.2.6. <i>Transformació de les cèl·lules competents</i>	189
2.3. <i>Tècniques d'obtenció i manipulació del RNA</i>	189
2.3.1. <i>Homogeneïtzació del teixit per a l'obtenció del RNA</i>	189
2.3.2. <i>Aïllament i purificació del RNA total</i>	190
2.3.3. <i>Síntesi del cDNA.....</i>	190
2.3.4. <i>Quantificació de l'expressió del mRNA per qPCR</i>	191
2.4. <i>Transfecció de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic</i>	192
2.5. <i>Producció, purificació i titulació dels vectors virals adenoassociats .</i>	193
2.5.1. <i>Producció i purificació</i>	193
2.5.2. <i>Titulació de genomes virals.....</i>	194

2.5.3. Quantificació de les partícules virals	196
2.6. Administració intracisterna magna dels vectors AAV9 a ratolins	196
2.7. Obtenció de mostres de sèrum <i>in vivo</i>	197
2.8. Eutanàsia i obtenció de mostres biològiques <i>post mortem</i> de ratolins	197
2.9. Western blot	198
2.9.1. Obtenció dels extractes proteics	198
2.9.2. Determinació de la concentració de proteïnes pel mètode del BCA	198
2.9.3. Electroforesis en gels d'acrilamida (SDS-PAGE)	199
2.9.4. Electrotransferència de les proteïnes a la membrana de PVDF	199
2.9.5. Incubació i revelat	199
2.10. Determinació de les activitats enzimàtiques	200
2.10.1. Quantificació del contingut proteic pel mètode del Bradford	200
2.10.2. Determinació de les activitats d'enzims lisosòmics.....	201
2.11. Quantificació del contingut de GAGs	202
2.12. Determinació del contingut de colesterol total al fetge	203
2.13. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs de parafina ...	203
2.14. Determinació de l'àrea positiva de les immunohistoquímiques de camp clar.....	204
2.15. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs d'OCT	204
2.16. Proves de comportament.....	205
2.16.1. Prova de l'Actímetre	205
2.16.2. Prova del Rotarod	205
2.16.3. Mesh test	206
2.16.4. Righting Reflex.....	206
2.16.5. Prova del <i>hindlimb clasping</i>	206
2.17. Anàlisi estadística	207
VIII. BIBLIOGRAFIA	209

I. PRESENTACIÓ

Les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff són malalties d'acumulació lisosòmica amb una herència autosòmica recessiva causades per la deficiència de la β -hexosaminidasa A (HEXA), un enzim necessari per catabolitzar el gangliòsid GM2. L'HEXA està format per dues subunitats α i β , codificades pels gens *HEXA* i *HEXB*, respectivament. La malaltia de Tay-Sachs està provocada per mutacions al gen *HEXA*, mentre que la malaltia de Sandhoff per mutacions al gen *HEXB*. Clínicament, les dues malalties són pràcticament indistingibles i es caracteritzen per presentar una severa neurodegeneració progressiva amb una greu afectació al sistema nerviós central (SNC). A causa de l'ampli espectre de signes i símptomes clínics, les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff es classifiquen en les següents formes: infantil, juvenil o adulta, on les formes infantils són les més habituals. Normalment, els pacients presenten alteracions en el desenvolupament, convulsions, rigidesa, problemes motors i un ràpid deteriorament que acaba provocant una mort prematura en les formes infantils, abans dels 5 anys, i juvenils, durant la segona dècada de vida.

Actualment, no hi ha cap tractament disponible aprovat comercialment per a aquestes malalties evidenciant la necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors virals derivats dels virus adenoassociats (AAV) ofereix una alternativa molt atractiva per al tractament de les malalties minoritàries d'origen genètic com serien les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, ja que permet la introducció d'una còpia correcta del gen que donarà lloc a una producció estable de l'enzim a llarg termini, amb un molt bon perfil de seguretat.

Per aquest motiu, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral va ser el desenvolupament d'una nova aproximació de teràpia gènica més eficient per al tractament tant de la malaltia de Tay-Sachs com la de Sandhoff.

En primer lloc, aquest treball es va centrar en el disseny de constructes duals que codificaven simultàniament pels dos gens murins *HexA* i *HexB* units per tres *linkers* diferents (L1, L2 o L3) per tal de generar un dímer estable de l'enzim HEXA. L'estudi *in vitro* d'expressió d'aquests constructes va demostrar que únicament els constructes amb l'ordre *HexA-Linker-HexB* eren funcionals. Posteriorment, en un estudi *in vivo* es va observar que els vectors AAV9-*HexA-L1-HexB* i AAV9-*HexA-L3-HexB* eren els més actius.

A continuació, es va avaluar l'eficàcia terapèutica de l'administració directament al líquid cefalorraquidi (LCR) dels vectors duals AAV9-*HexA-L1-HexB* i AAV9-*HexA-L3-*

HexB en el model murí de Sandhoff. Una única administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals en aquests animals va ser suficient per augmentar l'activitat β -hexosaminidasa al SNC, al fetge i al sèrum. Tres mesos després de l'administració dels vectors AAV9 duals, es va observar una reversió de l'acumulació del gangliòsid GM2 i del colesterol no esterificat al SNC, que va resultar en una correcció de l'homeòstasi lisosòmica, la neuroinflamació, l'autofàgia i els problemes de mielinització, alteracions que presenten els ratolins Sandhoff no tractats. L'augment de l'activitat β -hexosaminidasa al fetge i al sèrum va permetre també una normalització de les principals alteracions als teixits perifèrics. Els problemes locomotors, de coordinació, de força i de mobilitat també es van corregir. A més, es va allargar la supervivència unes 4,5 vegades en comparació als animals Sandhoff no tractats.

Finalment, l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de Tay-Sachs, el qual no presenta el fenotip característic de la malaltia humana ja que els ratolins tenen una via alternativa per degradar el gangliòsid GM2, també va resultar en un augment de l'activitat β -hexosaminidasa al SNC, al fetge i al sèrum.

En conjunt, els resultats d'aquest estudi han demostrat que l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals presentava una molt bona eficàcia terapèutica, ja que permetia revertir les alteracions patològiques i allargar la vida del model murí de Sandhoff, així com també augmentar l'activitat β -hexosaminidasa al model murí de Tay-Sachs. Per aquest motiu, aquest treball constitueix una base sòlida per a la translació a la clínica d'aquesta nova aproximació de teràpia gènica basada en l'administració directament al LCR dels vectors AAV9 duals per al tractament d'aquestes malalties.

II.INTRODUCCIÓ

1. MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica (*lysosomal storage disease*, LSD) són un conjunt d'aproximadament unes 70 malalties minoritàries metabòliques caracteritzades per una deficiència genètica en algun component necessari per al bon funcionament del lisosoma. En general, aquests gens codifiquen per enzims lisosòmics, tot i que també pels seus cofactors o bé proteïnes involucrades en el transport de materials al lisosoma. Aquests defectes genètics acaben produint l'acumulació de diversos productes no degradats a l'interior dels lisosomes, fenomen que provoca una alteració del correcte funcionament de les cèl·lules afectades, com per exemple un tràfic defectuós de vesícules, una desregulació en les vies de senyalització, o unes alteracions del flux autofàgic, de l'homeòstasi del calci o dels mitocondris, entre d'altres (Parenti, 2021; Winchester, 2000). L'acumulació de molècules parcialment degradades a l'interior dels lisosomes i totes les conseqüències que això comporta, finalment, acaben provocant la mort de la cèl·lula (Platt, 2018).

1.1. Lisosomes i enzims lisosòmics

Els lisosomes són uns orgànuls intracel·lulars presents en les cèl·lules animals, descrits per primera vegada l'any 1995 per en Christian de Duve (De Duve et al., 1995). Aquests orgànuls presenten un lumen àcid, pH 4,5-5, recobert per una bicapa lipídica. El sistema lisosòmic és el principal mecanisme intracel·lular encarregat del catabolisme de les macromolècules endògenes i exògenes, captades ja sigui per endocitosi, fagocitosi o autofàgia, amb la finalitat de reciclar els seus components monomèrics (Appelqvist, 2013; Winchester, 2000). Tot i això, ja no es descriuen com a orgànuls involucrats exclusivament en les vies catabòliques, sinó que també estan involucrats en múltiples funcions cel·lulars, com els processos de senyalització, el control de l'estat dels nutrients de la cèl·lula i, a més, també tenen la capacitat de rebre i adaptar-se als estímuls externs (Parenti, 2021).

Més de 200 proteïnes formen part dels lisosomes i contribueixen tant a la seva biologia com al seu bon funcionament. Aquestes proteïnes es poden classificar en dos tipus: les solubles i les de membrana (*lysosomal membrane proteins*, LMPs). La majoria de les proteïnes solubles són hidrolases àcides, aproximadament n'hi ha unes 60 de diversos tipus: com les sulfatases, les glucosidases, les peptidases, les lipases, les fosfatases, les nucleases, entre d'altres. D'aquesta manera, el lisosoma és capaç de degradar un ampli repertori de substrats biològics, gracies al pH àcid del seu interior on totes aquestes hidrolases àcides són actives (Settembre, 2013). A més, també hi ha

proteïnes solubles sense activitat enzimàtica, l'activador del gangliòsid GM2 (*GM2 activator*, GM2A), un cofactor proteic que estimula la hidròlisi enzimàtica del grup N-acetilgalactosamina (GalNAc) present en el gangliòsid GM2 (Shimada, 2003). Per altra banda, les LMPs es troben a la membrana lisosòmica i tenen múltiples funcions, com l'acidificació del lumen del lisosoma, el transport a través de la membrana lisosòmica, la interacció amb d'altres vesícules lisosòmiques o estructures cel·lulars o bé la intervenció en els processos de senyalització, d'estabilització de la membrana, d'exocitosi, entre d'altres. (Parenti, 2021; Saftig, 2009). Unes de les LMPs més abundants són les proteïnes lisosòmiques associades a la membrana tipus 1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*, LAMP1) i tipus 2 (*lysosomal-associated membrane protein 2*, LAMP2) (Saftig, 2009). Dins les LMPs, també trobem les bombes de protons transmembrana de tipus H⁺-ATPasa, que internalitzen protons al lumen dels lisosomes per mantenir el pH interior àcid per tal que les hidrolases àcides puguin dur a terme la seva activitat enzimàtica. Aquest pH àcid també protegeix a la cèl·lula d'una possible auto-digestió incontrolada a causa d'un trencament de la membrana lisosòmica, ja que el pH del citoplasma és d'aproximadament 7,2 on les hidrolases àcides són inactives (Lawrence, 2019).

Les proteïnes lisosòmiques se sintetitzen en el reticle endoplasmàtic rugós en la seva forma inactiva i es transporten al reticle endoplasmàtic llis gràcies a un pèptid senyal. En aquest nou orgànu cel·lular, es duu a terme la proteòlisi del pèptid senyal i les glicosilacions a l'extrem N-terminal, entre d'altres possibles modificacions post-traduccionals. Des del reticle endoplasmàtic llis, les vesícules carregades amb proteïnes lisosòmiques es dirigeixen cap a l'Aparell de Golgi (AG), on continuaran rebent modificacions post-traduccionals. Una de les més importants és la fosforilació dels residus de manosa que passen a convertir-se en manosa-6-fosfat (M6P) (Brulke, 2009; Ghosh, 2003) (Figura 1). Aquesta modificació es fa mitjançant l'acció de la fosfotransferasa, que s'encarrega de la fosforilació de la posició 6 de la manosa, i la diesterasa, que trenca l'enllaç fosfodièster entre el grup fosfat i la N-acetilglucosamina (Vellodi, 2005).

La M6P és un residu característic de la majoria de proteïnes lisosòmiques solubles, que les dirigeix principalment al lisosoma, gràcies al reconeixement d'aquesta senyal M6P per part dels receptors de manosa-6-fosfat (*mannose 6-phosphate receptor*, M6PR) durant el seu transport vesicular en el sistema trans-Golgi. Algunes proteïnes lisosòmiques solubles sense senyal M6P són transportades als lisosomes a través de receptors alternatius com les proteïnes lisosòmiques de membrana tipus 2 (*lysosomal*

integral membrane protein 2, LIMP2) o sortilines (Saftig, 2009). Per tal de dur a terme el transport de les proteïnes lisosòmiques a través del sistema trans-Golgi fins al lisosoma, els M6PR i les proteïnes lisosòmiques de membrana contenen unes seqüències peptídiques per incorporar-se a les vesícules de clatrina (Braulke, 2009; Luzio, 2014). Aquestes vesícules es fusionen amb els endosomes, uns orgànuls cel·lulars amb un pH al voltant de 5,5, que permeten la separació dels M6PR i els seus lligants per l'acidificació del medi. Quan els M6PR s'alliberen de la seva càrrega, es poden reciclar de nou en vesícules cap a l'AG (Figura 1) o bé, en petites quantitats, entre el 3-10% del total de M6PR presents a la cèl·lula, es dirigeixen cap a la membrana plasmàtica on participen en l'exocitosi i l'endocitosi de les proteïnes lisosòmiques (Riederer, 1994; Saftig, 2009) (Figura 2). Finalment, els endosomes es fusionen amb els lisosomes, on les proteïnes se sotmetran als últims passos de maduració mitjançant els processos de proteòlisi, plegament i agregació, i també es durà a terme la desfosforilació de la senyal M6P (Braulke, 2009; Makrypidi, 2012).

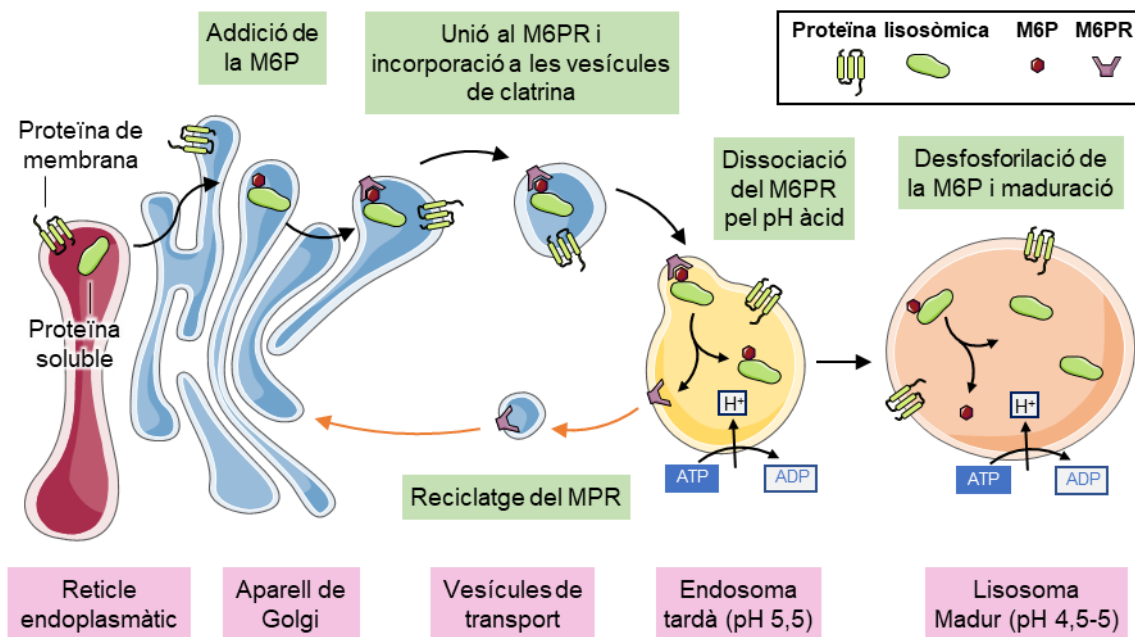


Figura 1. Representació esquemàtica del transport intracel·lular de les proteïnes lisosòmiques. En el reticle endoplasmàtic, se sintetitzen les proteïnes lisosòmiques en la seva forma inactiva i es transporten fins a l'AG. Allà, les proteïnes lisosòmiques solubles se'ls afegeix la senyal M6P, que els permet unir-se al M6PR i incorporar-se, juntament amb les proteïnes lisosòmiques de membrana, a les vesícules de clatrina. Aquestes vesícules es fusionen amb els endosomes tardans, on el pH àcid permetrà la separació de les proteïnes solubles i els M6PR i, en el cas dels M6PR, el seu posterior reciclatge (fletxes taronges). Per acabar, els endosomes tardans es fusionen amb els lisosomes, fet que permet la maduració final de les proteïnes lisosòmiques.

Com que no totes les proteïnes lisosòmiques es dirigeixen correctament cap als lisosomes, existeix una altra via d'arribada de les proteïnes lisosòmiques solubles als lisosomes, la via indirecta (Figura 2). Una part de les proteïnes que surten del sistema trans-Golgi segueixen la via clàssica de les proteïnes secretables i es fusionen directament amb la membrana plasmàtica, alliberant d'aquesta forma les proteïnes lisosòmiques solubles a l'espai extracel·lular (Saftig, 2009). Les cèl·lules també tenen M6PR a la membrana plasmàtica, per permetre que les proteïnes lisosòmiques puguin retornar a l'interior cel·lular i dirigir-se correctament als lisosomes, durant el procés d'endocitosi o fagocitosi (Parenti, 2015). Aquesta forma indirecta de captació de proteïnes lisosòmiques permet el fenomen de la correcció creuada (Figura 2). Aquest mecanisme és molt útil per al tractament de les LSD mitjançant la teràpia de substitució enzimàtica o bé la teràpia gènica, on no és necessària la correcció de totes les cèl·lules de l'organisme per obtenir un benefici terapèutic suficient per contrarestar la malaltia (Edelmann, 2020; Nagree, 2019).

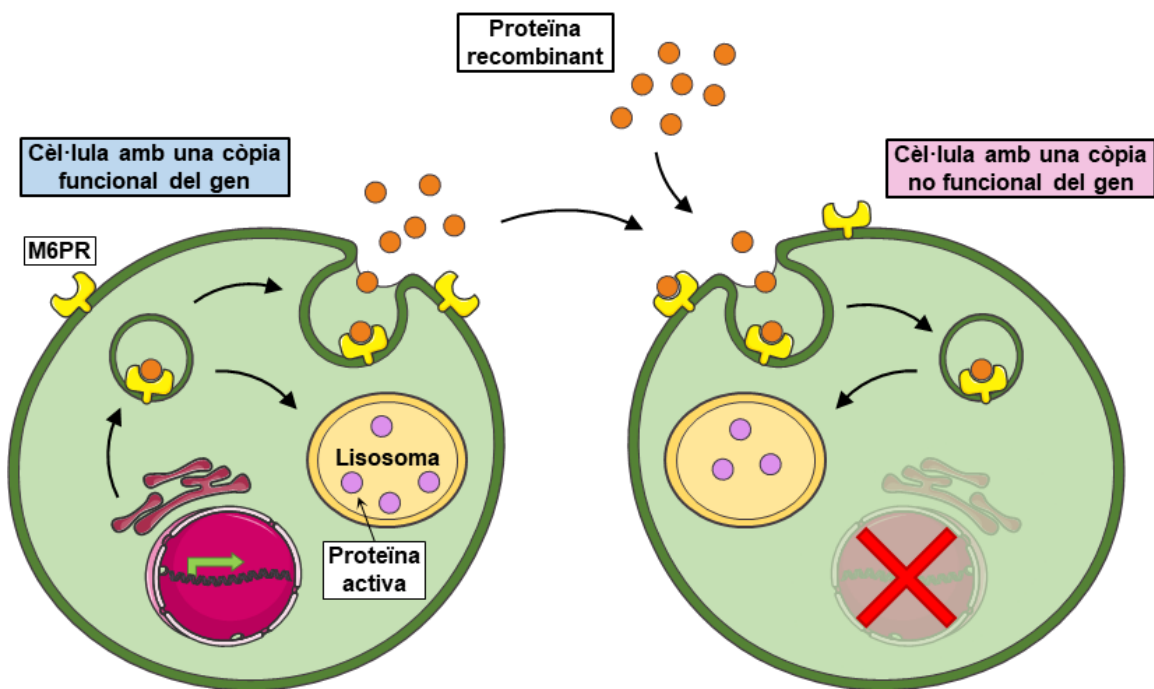


Figura 2. Representació esquemàtica de la correcció creuada. Algunes proteïnes lisosòmiques solubles produïdes en una cèl·lula no són dirigides al lisosoma, sinó que són secretades al medi extracel·lular. Aquest fet permet que les cèl·lules veïnes o distants, que expressen els M6PR a la seva membrana plasmàtica, poden captar aquestes proteïnes del medi extracel·lular i fer-les arribar als seus lisosomes. Aquest mecanisme és clau en algunes opcions terapèutiques per al tractament de les LSD, com per exemple la teràpia de substitució enzimàtica, on s'administra directament la proteïna recombinant al torrent sanguini o al líquid cefalorraquidi (LCR), o bé la teràpia gènica, on es modifica genèticament algunes cèl·lules de l'organisme per tal que la produeixin i secretin a circulació o al LCR. D'aquesta manera, les cèl·lules amb un defecte genètic que no poden sintetitzar la proteïna funcional, la capten del medi extracel·lular per tal de recuperar la seva funció al lisosoma.

1.2. Malalties d'acumulació lisosòmica

Tal com s'ha mencionat anteriorment, les LSD són un grup de malalties monogèniques que afecten al correcte funcionament del lisosoma (Platt, 2018). La majoria d'aquestes malalties presenten una herència autosòmica recessiva, amb l'excepció del Síndrome de Hunter o Mucopolisacaridosi tipus II (MPS II) i la malaltia de Fabry, que tenen una herència recessiva lligada al cromosoma X; i la malaltia de Danon, que en aquest cas presenta una herència dominant lligada al cromosoma X (Wilcox, 2004).

Les LSDs es consideren malalties rares o minoritàries, si presenten una incidència menor a un de cada 2.000 habitants, segons la Unió Europea, o bé si afecten a menys de 200.000 pacients als Estats Units. És realment difícil arribar a un consens de la incidència exacta per cada una de les LSD, bàsicament pel fet que pot variar molt la incidència en funció de l'àrea geogràfica estudiada i de l'eficiència en el seu diagnòstic. En general, s'estima que la incidència de les LSDs és d'aproximadament un pacient afectat de cada 5000-8000 naixements (Parenti, 2015; Platt, 2018), encara que segurament augmentaria si es tinguessin en compte tots els casos no diagnosticats o mal diagnosticats.

Les LSDs són un grup de malalties molt heterogeni que afecten a diversos òrgans i teixits. Freqüentment, són malalties infantils o juvenils, tot i que, en alguns tipus de LSD, també existeixen formes adultes. Es poden presentar com a malalties amb caràcter neurodegeneratiu, que sovint van acompanyades de visceromegàlies, o bé no presentar cap tipus d'afectació al sistema nerviós central (SNC) i tenir una patologia principalment perifèrica i progressiva amb l'edat. En general, la majoria d'aquestes malalties presenten una disminució significativa de l'esperança de vida dels pacients. La classificació clínica de les LSDs normalment es determina segons el substrat acumulat (Taula 1) (Parenti, 2015; Platt, 2018).

Taula 1. Classificació de les LSD indicant el gen afectat i el substrat acumulat.

Nom de la malaltia o síndrome	Gen mutat	Substrat acumulat
Defectes de la degradació dels esfingolípid		
Malaltia de Fabry	GLA	Globotriaosilceramida
Lipogranulomatosis de Farber	ASAH1	Ceramida
Malaltia de Gaucher		
Tipus I, II i III	GBA	Glucocerebròsid i glucoesfingosina
Gaucher variant	PSAP	Glucocerebròsid i glucoesfingosina
GM1 gangliosidosis	GLB1	GM1, keratan sulfat i oligosacàrids
GM2 gangliosidosis		GM2, glicosaminoglicans i glicoesfingolípid
Malaltia de Tay-Sachs	HEXA	
Malaltia de Sandhoff	HEXB	
Deficiència de l'activador GM2	GM2A	
Leucodistròfia de cèl·lules globoïdes (Malaltia de Krabbe)	GALC	Galactocerebròsid i psicósina
Leucodistròfia metacromàtica	ARSA, PSAP	Compostos sulfatats
Malaltia de Niemann-Pick tipus A i B	SMPD1	Esfingomielina
Defectes de la degradació i transport del colesterol		
Malaltia de Niemann-Pick tipus C1	NPC1	Colesterol i esfingolípid
Malaltia de Niemann-Pick tipus C2	NPC2	Colesterol i esfingolípid
Deficiència de la Lipasa Àcida Lisosòmica	LIPA	Èsters de colesterol, triglicèrids i altres lípid
Malaltia de Wolman		
Malaltia d'acumulació d'èsters de colesterol (CESD)		
Defectes de la degradació dels glicosaminoglicans		
MPS I (Síndrome de Hurler, Scheie i Hurler- Scheie)	IDUA	Dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS II (Síndrome de Hunter)	IDS	Dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS III (Síndrome de Sanfilippo)		
MPS IIIA	SGSH	Heparan sulfat
MPS IIIB	NAGLU	Heparan sulfat
MPS IIIC	HGSNAT	Heparan sulfat
MPS IIID	GNS	Heparan sulfat
MPS IV (Síndrome de Morquio)		
MPS IVA	GALNS	Keratan sulfat i condroitin-6-sulfat
MPS IVB	GLB1	Keratan sulfat
MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)	ARSB	Dermatan sulfat
MPS VII (Síndrome d'Sly)	GUSB	Dermatan sulfat, heparan sulfat i condroitin- 6-sulfat
MPS IX (Síndrome de Natowicz)	HYAL1	Àcid hialurònic
Defectes de la degradació del glicogen		
Malaltia de Pompe	GAA	Glicogen
Defectes de la degradació de les glicoproteïnes		
α-Manosidosi	MAN2B1	Oligosacàrids enriquits en manosa
β-Manosidosi	MANBA	Man(β1>4)N-acetilglucosamina
Fucosidosi	FUCA1	Oligosacàrids enriquits en fucosa, glicoproteïnes i glicolípid
Aspartilglucosaminúria	AGA	Aspartilglucosamina
Malaltia de Schindler	NAGA	Glicoesfingolípid, asialoglicopèptid i glicopèptid sialilats
Sialidosi	NEU1	Oligosacàrids sialilats, glicopèptid i APP
Galactosialidosi	CTSA	Oligosacàrids sialilats i glicopèptid

Taula 1. Classificació de les LSD indicant el gen afectat i el substrat acumulat (continuació).

Nom de la malaltia o síndrome	Gen mutat	Substrat acumulat
Defectes de la modificació post-traducciona l de les proteïnes		
Deficiència múltiple de sulfatases	<i>SUMF1</i>	Compostos sulfatats
Mucopolidiosi II α/β	<i>GNPTAB</i>	Oligosacàrids, glicosaminoglicans i glicoesfingolípid
Mucopolidiosi III γ	<i>GNPTG</i>	Oligosacàrids, glicosaminoglicans i glicoesfingolípid
Defectes de la degradació de la lipofuscina		
CLN1 (<i>Malaltia de Haltia-Santavuori</i>)	<i>PPT1</i>	Lipofuscina
CLN2 (<i>Malaltia de Jansky-Bielschowsky</i>)	<i>TPP1</i>	Lipofuscina
CLN3 (<i>Malaltia de Batten-Spielmeyer-Sjogren</i>)	<i>CLN3</i>	Lipofuscina
CLN4 (<i>Malaltia de Parry i Kufs</i>)	<i>DNAJC5</i>	Lipofuscina
CLN5	<i>CLN5</i>	Lipofuscina
CLN6 (<i>Malaltia de Lake-Cavanagh</i>)	<i>CLN6</i>	Lipofuscina
CLN7	<i>CLN7</i>	Lipofuscina
CLN8	<i>CLN8</i>	Lipofuscina
CLN9	Desconegut	Lipofuscina
CLN10	<i>CTSD</i>	Lipofuscina
CLN11	<i>GRN</i>	Lipofuscina
CLN12 (<i>Síndrome de Kufor-Rakeb</i>)	<i>ATP13A2</i>	Lipofuscina
CLN13	<i>CTSF</i>	Lipofuscina
CLN14	<i>KCTD7</i>	Lipofuscina
Defectes de la degradació dels polipèptids		
Picnodisostosi (<i>Síndrome de Toulouse-Lautrec</i>)	<i>CTSK</i>	Col·lagen de la matriu òssia
Defectes del transport lisosòmic		
Cistinosi	<i>CTNS</i>	Cistina
Malaltia de Danon	<i>LAMP2</i>	Residus citoplasmàtics i glicogen
Malaltia de Salla	<i>SLC17A5</i>	Àcids siàlics
Malaltia d'emmagatzematge d'àcid siàlic infantil	<i>SLC17A5</i>	Àcids siàlics
Mucopolidiosi IV	<i>MCOLN1</i>	Lípids i glicosaminoglicans
Malaltia de Hermansky-Pudlak tipus 1-7	<i>HPS1-HPS7</i>	Lipofuscina
Malaltia de Chédiak-Higashi	<i>LYST</i>	Acumulació de substrats vari
Síndrome de Griscelli		
Tipus 1 (<i>Síndrome d'Elejalde</i>)	<i>MYO5A</i>	Acumulació de substrats vari
Tipus 2	<i>RAB27A</i>	Acumulació de substrats vari

CLN: Lipofuscinosi ceroides neuronal; MPS: Mucopolisacàridosi. Adaptada de Wilcox, 2004; Futerman, 2004 i Sun, 2018

2. GANGLIOSIDOSIS GM2

Al 1881, l'oftalmòleg Warren Tay va ser el primer a descriure detalladament una taca vermella-cirera a la fòvea d'un infant de 12 mesos d'edat, que també presentava debilitat al coll i a les extremitats i signes de degeneració progressiva del SNC (Tay, 1969, Maegawa et al., 2012). Tres anys més tard, el doctor Tay va descriure dos fills més de la mateixa família amb una afectació similar (Kaback and Desnick, 2001).

Al 1896, el neuròleg Bernard Sachs va publicar diversos casos de nadons amb el trastorn descrit prèviament pel doctor Tay. En va destacar la naturalesa familiar de la malaltia amb una aparició primerenca de ceguera, un retard greu i una mort prematura durant la infància, la va anomenar "idiotesa amauròtica familiar" (Sachs, 1896). Més tard, després de més de 130 nens afectats registrats a la literatura mèdica, en David Slome va proposar que l'herència de la malaltia era autosòmica recessiva (Slome, 1933).

Al 1930, el bioquímic Ernest Klenk va identificar el material que s'acumulava a l'encèfal dels pacients amb "idiotesa amauròtica familiar" com un nou grup de glicoesfingolípids acídics (Schuette, 1999). Posteriorment, en Lars Svennerholm va identificar el gangliòsid GM2 com al principal component acumulat a dins de les neurones dels pacients afectats per la malaltia de Tay-Sachs (Svennerholm, 1962). Finalment, en Shintaro Okada i en John S. O'Brien van descobrir el defecte enzimàtic de l'hexosaminidasa isoforma A (HEXA) com la causa de la malaltia de Tay-Sachs i, a més, van demostrar que els pacients es podien diagnosticar amb l'assaig d'activitat enzimàtica d'HEXA (Okada, 1969).

Després de l'estudi d'un cas excepcional d'un pacient amb "idiotesa amauròtica familiar" amb patologia somàtica, en Konrad Sandhoff va descriure la malaltia de Sandhoff (Sandhoff, 1969). I, juntament amb l'Ernst Conzelmann, van descriure la deficiència de l'activador GM2, una nova forma de les gangliosidosis GM2 diferent de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, descrites prèviament (Conzelmann, 1978).

2.1. Incidència de les gangliosidosis GM2

Les gangliosidosis GM2 tenen una herència autosòmica recessiva, per tant, els individus portadors de les mutacions causants de la malaltia no presenten cap patologia.

La malaltia de Tay-Sachs té una incidència d'1/320.000 naixements i una freqüència de portadors d'1/250 a la població general (Lew, 2015). S'ha descrit entre tots els grups racials i ètnics, però hi ha certes poblacions amb una incidència de la malaltia de Tay-Sachs més elevada, com els jueus Asquenazites, els franco-canadencs, els irlandesos, els holandesos de Pennsilvània i les comunitats del cajun de Louisiana (Toro, 2020). Abans de l'arribada dels programes de cribratge d'educació i assessorament als portadors de les comunitats jueves per a la prevenció de la malaltia de Tay-Sachs, la incidència era d'1/3.600 naixements i la taxa de portadors d'1/30 entre la població jueva Asquenazita. Després d'aquests programes, la incidència de la malaltia es va reduir més d'un 90% (Kaback, 1974; Toro, 2020).

En el cas de la malaltia de Sandhoff, s'estima que la incidència és d'un de cada 422.000 naixements, amb una freqüència portadora d'entre 1/276 i 1/310 a la població general (Cachon-Gonzalez, 2018). La freqüència portadora més alta s'ha detectat a la regió de Còrdova d'Argentina (Triggs-Raine, 2001), a la comunitat endogàmica d'indis metis del nord de Saskatchewan (Canadà) i al Líban (Fitterer, 2014).

2.2. El gangliòsid GM2

El GM2 és un gangliòsid que pertany al grup dels glicoesfingolípids que contenen un o més residus d'àcid siàlic. Actualment, s'han identificat uns 180 gangliòsids presents a tots els teixits, tot i que són molt més abundants al cervell (Leal, 2020). El 5% del total dels gangliòsids localitzats a l'encèfal correspon al gangliòsid GM2, que està format per un únic àcid siàlic com el GM1 i el GM3. El GM2 es compon per un residu de N-acetilgalactosamina unit a un residu de galactosa, el qual està unit a un residu de glucosa que també està unit a una ceramida (Figura 3). El residu de galactosa conté un residu d'àcid siàlic unit a través d'un enllaç α -glicosídic (Leal, 2020; Schnaar, 2019).

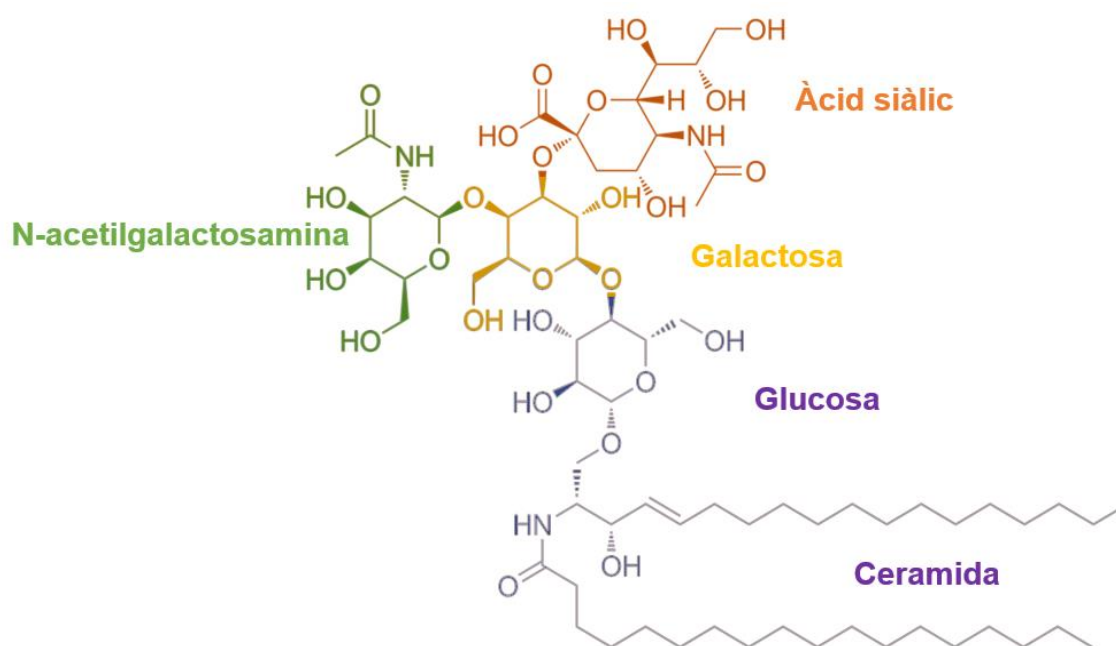


Figura 3. Estructura del gangliòsid GM2. El gangliòsid GM2 està format per un residu de N-acetilgalactosamina unit a un residu de galactosa, el qual està unit a un residu de glucosa unit a una ceramida. A més, el gangliòsid GM2 està unit a un únic àcid siàlic.

Els gangliòsids estan localitzats a les capes externes de les membranes plasmàtiques cel·lulars ubicats en basses lipídiques (*lipid rafts*). Les basses lipídiques són agrupacions heterogènies de lípids formades principalment per colesterol, esfingolípids, gangliòsids i proteïnes associades a la membrana (Bisel, 2014). Intervenen en les funcions d'organització de la membrana cel·lular, diferenciació neuronal, adhesió cel·lular, transducció de senyals i reconeixement entre cèl·lules, entre d'altres (Yu, 2011). Ara bé, el rol precís dels gangliòsids a les cèl·lules continua essent força enigmàtic, tot i que la presència d'anomalies secundàries a l'acumulació dels

gangliòsids a diverses LSD suggereix que poden realitzar funcions biològiques importants. Per exemple, una de les principals anomalies després d'un augment del gangliòsid en algun tipus de neurones madures és el creixement de noves dendrites. El fet que també s'hagi detectat un brot dendrític a neurones immadures, tot coincidint amb un increment del gangliòsid GM2, proporciona un argument convincent que aquest gangliòsid juga un paper rellevant en la iniciació dendrítica (Walkley, 2003).

2.2.1. Catabolisme del gangliòsid GM2

El catabolisme dels gangliòsids té lloc al compartiment endo-lisosòmic després de l'endocitosi de fragments o regions de la membrana plasmàtica. El pas clau de la degradació del GM2 depèn directament de la funció de l'enzim lisosòmic HEXA i el suport essencial d'una proteïna transferidora de lípids, el GM2A. Ambdues proteïnes s'encarreguen d'eliminar el residu terminal N-acetilgalactosamina del GM2 i, per tant, convertint-lo en GM3 (Figura 4) (Kolter, 2012).

Concretament, la conformació oberta i buida del GM2A interacciona amb la membrana del compartiment endo-lisosòmic, tot endinsant els seus dos bucles (*loops*) hidrofòbics (marcats amb rosa, Figura 5) a la part també hidrofòbica de la bicapa lipídica de la membrana lisosòmica. La interacció amb el gangliòsid GM2 genera un canvi de conformació del GM2A d'oberta a tancada, canviant a una forma més hidrosoluble. Actualment, encara està en debat si el complex que es forma queda ancorat a la membrana o bé es desuneix, tot exposant el gangliòsid GM2 a l'enzim soluble HEXA per a la seva degradació (Anheuser, 2019; Sandhoff, 2013). El GM2A té una regió de reconeixement d'HEXA que li permet interaccionar simultàniament amb el gangliòsid GM2 i l'HEXA, la unió formada per les tres molècules és necessària per a la hidròlisi del residu N-acetilgalactosamina, convertint d'aquesta forma el gangliòsid GM2 en GM3 (Figura 5).

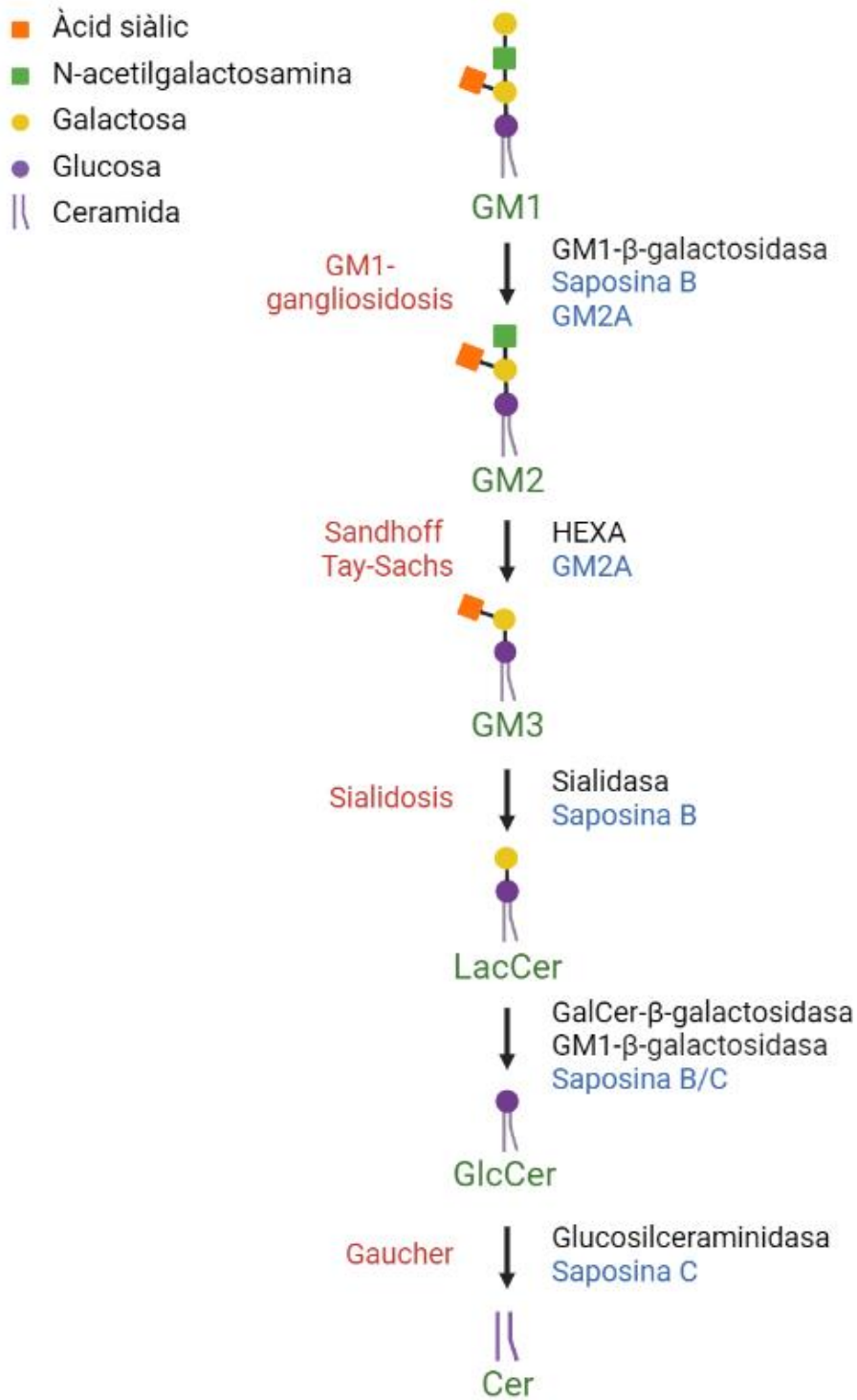


Figura 4. Catabolisme del gangliòsid GM2. L'esquema il·lustra els enzims (en negre) i les seves proteïnes activadores (en blau) implicats en la degradació dels gangliòsids GM1, GM2 i GM3. En vermell, s'indica la malaltia que és causada per la deficiència de l'enzim involucrat en el pas del catabolisme dels glicolípid representats a la figura. Adaptada de (Sandhoff, 2018).

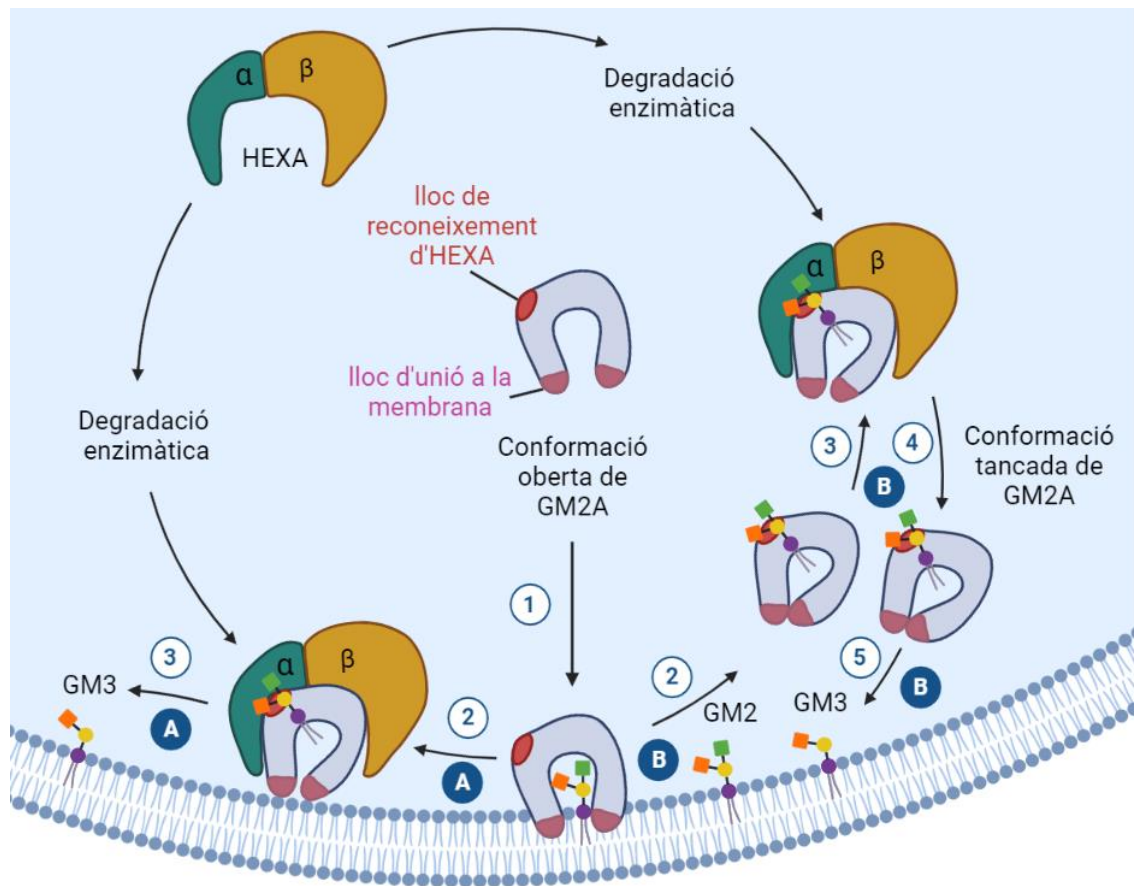


Figura 5. Esquema de la degradació enzimàtica del gangliòsid GM2. L'enzim HEXA juntament amb el GM2A degraden el gangliòsid GM2, ancorat a la membrana de la superfície luminal dels lisosomes. (1) El GM2A, en la seva conformació oberta, penetra dins la regió hidrofòbica de la bicapa lipídica gràcies als seus dos bucles (*loops*) hidrofòbics, marcats de color rosa. La cavitat hidrofòbica del GM2A incorpora la ceramida del gangliòsid GM2. Aquesta interacció li permet un canvi de conformació, cap a una forma més tancada, per a ser més soluble en solucions aquoses. (2) Actualment, encara està en debat si el complex es manté a la membrana (A) o bé es desuneix, tot exposant el GM2 a l'enzim soluble HEXA per a la seva degradació (B). En el cas (A), quan el complex no es desuneix de la membrana, (3) l'enzim HEXA s'uneix al seu lloc de reconeixement al complex del GM2A per tal d'hidrolitzar el residu de N-acetilgalactosamina del gangliòsid GM2 per a generar el GM3 i deixar-lo de nou a la membrana lisosòmica. En el cas (B), (3) el complex desunit de la membrana lisosòmica és reconegut per l'enzim HEXA que degrada el gangliòsid GM2 al lumen del lisosoma. Seguidament, (4) se separa el GM2A de l'HEXA i, finalment, (5) el GM2A torna el gangliòsid GM3 a la membrana lisosòmica. Adaptada de(Breiden. 2019).

2.3. Característiques moleculars de les gangliosidosis GM2

2.3.1. Gen *HEXA*, *HEXB* i *GM2A*

El gen *HEXA* (Gene ID: 3073) codifica per la subunitat α de la β -hexosaminidasa, mentre que el gen *HEXB* (Gene ID: 3074), per la subunitat β . En humans, les subunitats α i β estan ubicades al cromosoma 15q23 i 5q13.3, respectivament (Zwierz, 1999). L'*HEXA* té 14 exons que es troben al llarg de 35 kb, i l'*HEXB*, 14 exons en una longitud de 40 kb (Proia, 1988). Les seqüències dels dos gens comparteixen un 57% d'identitat, suggerint un possible ancestre en comú (Zwierz, 1999). Les dues seqüències presenten més homologia a la part central, sobretot en els seus centres catalítics (Mark, 2003). El gen *GM2A* (Gene ID: 2760) humà es troba al cromosoma 5q33.1, té 4 exons i un total de 16 kb de seqüència (Schröder, 1989).

En el cas del ratolí, el gen *HexA* (Gene ID: 15211) està ubicat al cromosoma 9, té un total de 15 exons i una longitud de 25 kb. El gen *HexB* (Gene ID: 15212) està situat al cromosoma 13 i té 14 exons al llarg de 22 kb. I, finalment, el gen *GM2A* (Gene ID: 14667) està al cromosoma 11 i té un total de 4 exons i 15 kb de llargada. Les seqüències de les subunitats α i β de ratolí amb les seqüències humanes comparteixen un 51% i un 72% d'identitat, respectivament (Zwierz, 1999).

2.3.2. β -Hexosaminidases

De tots els enzims lisosòmics de la cèl·lula, les hexosaminidases són les més abundants, fet que les va fer una diana perfecta pel seu estudi. Desafortunadament, van resultar ser un dels sistemes d'isoenzims més complexos del lisosoma (Mahuran, 1991).

Les β -hexosaminidases són enzims lisosòmics dimèrics compostos per dues subunitats, ja sigui l' α i/o la β , per formar les isoformes *HEXA* ($\alpha\beta$), *HEXB* ($\beta\beta$) i *HEXS* ($\alpha\alpha$) amb la capacitat de degradar diferents substrats (Figura 6). En els humans sans, l'*HEXA* i l'*HEXB* es troben en quantitats comparables, mentre que en els teixits d'un malalt de Sandhoff es pot detectar una petita quantitat d'*HEXS*, ja que no té la subunitat β . Els tres isoenzims són capaços d'hidrolitzar residus de N-acetilgalactosamina i N-acetilglucosamina units amb un enllaç β (Mark, 2003). Tant l'*HEXA* com l'*HEXB* poden degradar glicosaminoglicans (GAGs), oligosacàrids (glicoproteïnes i glicolípid) i glicoconjugats, l'*HEXS* també es capaç de degradar GAGs (Figura 6). Tot i això, l'*HEXA* és l'única isoforma capaç de degradar el gangliòsid GM2 en presència del GM2A, ja que és l'únic isoenzim que pot interaccionar amb el complex GM2-GM2A (Solovyeva, 2018) (Figura 5 i 6). Tant la subunitat α com la β contenen un centre actiu per a la degradació

del GM2, però la formació dels dímers és indispensable per tal que sigui un isoenzim funcional (Mark, 2003).

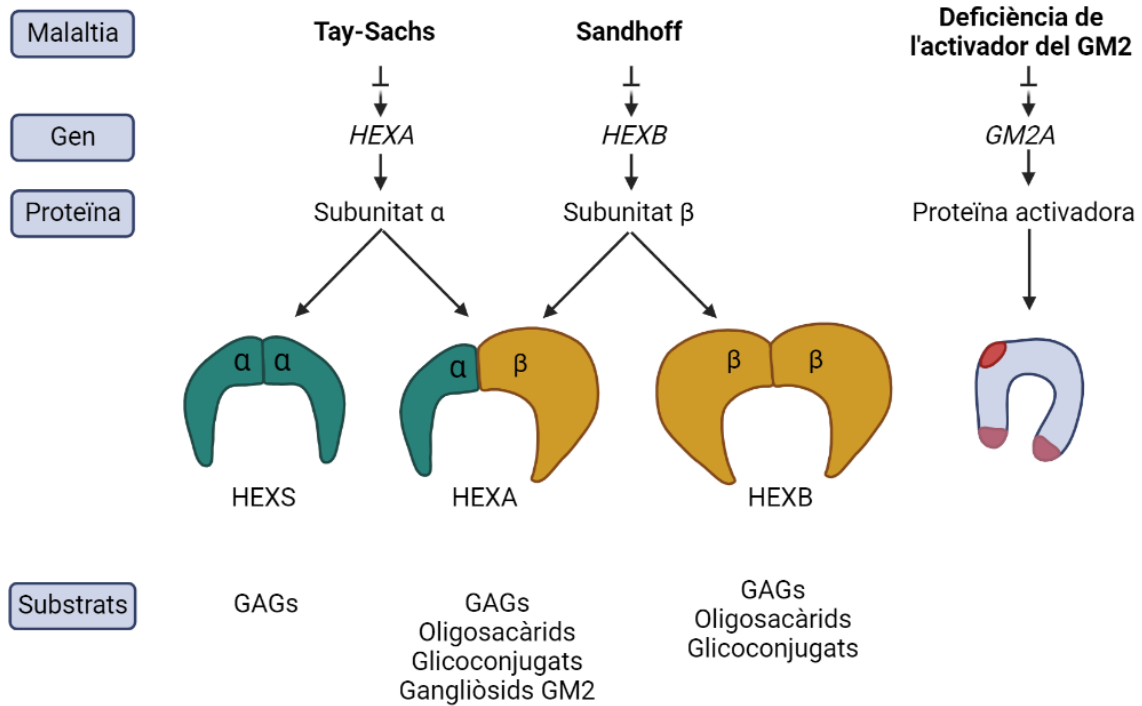


Figura 6. Tipus de gangliosidosis GM2 juntament amb el gen, la proteïna i els substrats involucrats a la malaltia. Les gangliosidosis GM2 es divideixen en tres subtipus diferents: la malaltia de Tay-Sachs, la malaltia de Sandhoff i la deficiència de l'activador del GM2. Aquestes malalties presenten fenotips molt similars, però es diferencien principalment en el mecanisme patològic que altera el catabolisme del gangliòsid GM2 i d'altres lípids relacionats, és a dir, el gen, la proteïna i els substrats involucrats en cada malaltia. Les gangliosidosis GM2 són causades per defectes a una subunitat (α o β) de l'enzim β-hexosaminidasa (malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, respectivament) o al GM2A. Adaptada de (Breiden, 2019)

En condicions normals, la subunitat α (menys estable) i la subunitat β (més estable) se sintetitzen aproximadament en proporcions equimolars; no obstant això, dimeritzen a diferents ràtios. Els homodímers αα (HEXS) són altament inestables i la majoria queden retinguts al reticle endoplasmàtic on acaben essent degradats. Per altra banda, la dimerització d'homodímers ββ (HEXB) és molt favorable i formen l'isoenzim més estable; mentre que l'heterodímer αβ (HEXA) és més inestable, però no tant com l'HEXS. Es creu que altes concentracions de la subunitat α en el reticle endoplasmàtic força la síntesi de l'heterodímer HEXA (Zwierz, 1999).

Les gangliosidosis GM2 són causades per la deficiència en una de les 3 proteïnes necessàries per degradar el gangliòsid GM2: 1) la malaltia de Tay-Sachs causada per la deficiència en la subunitat α de les β-hexosaminidases, fet que no permet

formar ni l'HEXA ni l'HEXS; 2) la malaltia de Sandhoff provocada per la deficiència en la subunitat β de les β -hexosaminidases i, per tant, no hi ha ni l'HEXA ni l'HEXB funcionals; i finalment, 3) la deficiència en l'activador del GM2, on les tres isoformes estan intactes, però no es pot degradar el gangliòsid GM2 per la deficiència del GM2A (Lawson, 2016) (Figura 6).

2.3.2.1. Enzim Hexosaminidasa A (HEXA)

Les subunitats α i β humanes se sintetitzen al reticle endoplasmàtic rugós com a precursors més llargs de 529 i 556 aminoàcids amb un pes molecular de 67 i 63 kDa, respectivament. Seguidament, ambdues subunitats α i β es proteolitzaran per tal de deixar uns pèptids de 54 i 52 kDa, respectivament (HasilikS, 1980). Finalment, la subunitat β pateix una altra proteòlisi per obtenir dues cadenes polipeptídiques, la β_a i la β_b , de 28 i 27kDa, respectivament, que s'uneixen entre elles per ponts disulfur (Mahuran, 1988; O'Dowd, 1986). En el cas de les subunitats murines, les seqüències d'aminoàcids tenen molta homologia amb les humanes, un 83% per la subunitat α i un 74% per la β , i els seus precursors presenten una llargada de 528 i 536 aminoàcids, respectivament. La subunitat α i β passen pels mateixos processos proteolítics i les mateixes modificacions post-traduccionals que les subunitats de l'enzim humà (Bapat, 1988; Beccari, 1992).

Durant el tràfic de les proteïnes des del reticle endoplasmàtic a l'AG, les dues subunitats rebran modificacions post-traduccionals, com per exemple, N-glicosilacions i fosforilacions. A la subunitat α , l'asparagina 115, 157 i 295 s'han identificat com a possibles llocs de N-glicosilació; mentre que a la subunitat β , es poden N-glicosilar les asparagines 84, 142, 190 i 327 (O'dowd, 1988). Unes de les modificacions post-traduccionals més importants és la incorporació de la manosa-6-fosfat a les cadenes laterals dels oligosacàrids per tal de dirigir-los correctament cap als lisosomes. Després d'aquestes modificacions, les subunitats es dimeritzen per formar els enzims actius (Solovyeva, 2018).

Tot i que la hidròlisi del gangliòsid GM2 només pot ser catalitzada per la subunitat α de l'isoenzim HEXA, s'han descrit dos llocs actius a l'heterodímer, un a cada subunitat, l' α i la β (Lemieux, 2006). Els centres actius de les subunitats α i β són pràcticament idèntics amb la majoria de residus altament conservats, a excepció de: β Asp426 \rightarrow α Glu394, β Asp452 \rightarrow α Asn423 i β Leu453 \rightarrow α Arg424, que probablement serien els aminoàcids que confereixen a la subunitat α l'habilitat per poder acomodar residus amb càrrega negativa (Mark, 2003). Un model 3D que prediu la interacció entre la subunitat

α i el gangliòsid GM2 suggereix que el carboxil carregat negativament de l'àcid siàlic que conté el gangliòsid GM2 s'estabilitza per la càrrega positiva del grup guanidino de l'Arginina 424 mitjançant enllaços d'hidrogen. L' α Glu394 i l' α Asn423 es creu que ajuden a estabilitzar l'Arg424 a la seva posició (Mark, 2003). A més, l'aspartat 322 i 354 de les subunitats α i β , respectivament, contribueixen a l'estabilització necessària durant l'atac nucleòfil a la N-acetilgalactosamina (Lemieux, 2006).

2.3.3. Mutacions als gens de la β -hexosaminidasa

Segons la base de dades *Human Gene Mutation Database* (HGMD), actualment s'han descrit 182, 112 i 10 mutacions en els gens *HEXA*, *HEXB* i *GM2A*, respectivament (Figura 7 i 8). Aquestes mutacions inclouen: mutacions sense sentit (*nonsense*), de sentit erroni (*missense*), de *splicing* (tall i empalmament), petites insercions i/o delecions o bé grans delacions (Taula 2). Aquests tipus de mutacions poden provocar deficiències en la transcripció i la traducció, el mal plegament de les proteïnes o bé disfuncions en la dimerització de l'enzim o en la seva funció catalítica. Les formes més comunes i greus de les gangliosidosis GM2 normalment es troben quan hi ha una manca completa de l'activitat d'HEXA (Mahuran, 1999). A més, existeix una variant de la malaltia Tay-Sachs, variant B1, que quan mesura l'activitat β -hexosaminidasa amb els substrats sintètics detecta nivells normals d'activitat, però si es realitzen les proves amb el substrat natural, el gangliòsid GM2, es pot detectar la deficiència (Gordon, 1988).

Taula 2. Tipus de mutació dels diferents gens involucrats en les gangliosidosis GM2.

	HEXA	HEXB	GM2A
Sentit erroni/ sense sentit	105	52	6
<i>Splicing</i>	34	22	0
Petites delecions	29	23	3
Petites insercions	10	5	0
Petites inserció/deleció	3	1	1
Grans delecions	1	9	0
Total	182	112	10

Taula adaptada de la base de dades *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (www.hgmd.cf.ac.uk).

En general, el tipus i la freqüència de les mutacions està molt relacionada amb l'origen demogràfic dels pacients. Tot i això, la mutació més freqüent del gen *HEXA* és la transició d'un aminoàcid c.533G>A, que canvia una arginina per una histidina (p.R178H) i afecta al lloc catalític de la subunitat α , alterant-ne la seva funció i estabilitat (Rosario, 1991; Tanaka, 1988). En el cas del gen *HEXB*, la mutació més freqüent és la mutació c.445 + 1 G > A, que es produeix en un intró altament conservat que promou una pèrdua completa d'un lloc de *splicing* (Kleiman, 1994; Zampieri, 2012). Finalment,

Si ens centrem en els tipus de mutacions i l'origen demogràfic dels pacients, els jueus Asquenazites presenten principalment tres tipus de mutacions al gen *HEXA*: una inserció de 4 nucleòtids a la posició 1278 (1278ins4), una mutació de *splicing* a la posició 1421 (1421+1G→C) i una mutació puntual que provoca un canvi d'aminoàcids (Gly269Ser), les quals representen el 98% dels al·lels causants de la malaltia de Tay-Sachs en aquesta població (Grebner, 1991; Paw, 1990a; Triggs-Raine, 1990). A la població franco-canadenca de l'est del Quebec, s'ha identificat una mutació única, la mutació de *splicing* 805+1G→A (Hechtman, 1992). En el cas de la població holandesa de Pennsilvània, la mutació que es troba a la majoria dels al·lels causants de la malaltia de Tay-Sachs és la mutació de *splicing* 1073+1G→A (Mules, 1992a). Per altra banda, la població del Cajun de Louisiana presenten majoritàriament la inserció de 4 nucleòtids a la posició 1278 (1278ins4) (McDowell, 1992), mentre que la població jueva del Marroc, la deleció de tres nucleòtids a la posició 910 (910del3) (Navon, 1991). Finalment, s'ha descobert una mutació relativament comuna entre els pacients de la malaltia de Tay-Sachs, la mutació de *splicing* 1073+1G→A, la qual representa el 10% dels al·lels mutats entre la població no jueva (Akerman, 1992).

En el cas dels pacients afectats per la malaltia de Sandhoff, la zona amb la freqüència més elevada de portadors d'al·lels mutats (1/26) és la regió de Còrdova a Argentina (Brown, 1992). De fet, en aquesta zona s'ha detectat que 30/31 al·lels examinats presenten la mateixa mutació de *splicing*, la intró2+1G→A (Brown, 1992). En pacients japonesos, franco-canadencs i italians, la mutació puntual que provoca un canvi d'aminoàcid Pro417Leu és la més prevalent (Gomez-Lira, 1995; McInnes, 1992a; Wakamatsu, 1992).

Per altra banda, també cal destacar que tant el gen *HEXA* com l'*HEXB* poden presentar una deleció molt gran a l'extrem 5' (Figura 7 i 8). Aquestes mutacions impedeixen la producció de la subunitat afectada i, per tant, els pacients homozigots per la deleció tenen una falta total de l'expressió de l'enzim HEXA i la seva corresponent activitat (Triggs-Raine, 2001). En general, aquesta mutació al gen *HEXA* està associada a una petita població de franco-canadencs de l'est del Quebec, la qual representa el 80% dels al·lels mutats (Hechtman, 1990). Mentre que la deleció de 16kb del gen *HEXB* és present amb una alta freqüència a 8 de cada 30 al·lels analitzats del total de pacients de la malaltia de Sandhoff (Bikker, 1990).

A més a més, també s'han identificat diverses mutacions que produeixen un codó *stop* prematur, com la mutació majoritària en el gen *HEXA* a la població Asquenazita a causa d'una inserció de 4 nucleòtids a la posició 1278 (1278ins4), que produeix un

mRNA inestable i truncat (Myerowitz, 1984). Finalment, també s'han descrit algunes mutacions puntuals, com la 1444G→A. Aquesta mutació es va identificar a un pacient italià i produeix el canvi d'un aminoàcid carregat negativament cap a un carregat positivament que resulta en una proteïna insoluble que no pot sortir del reticle endoplasmàtic (Mahuran, 1991; Nakano, 1988).

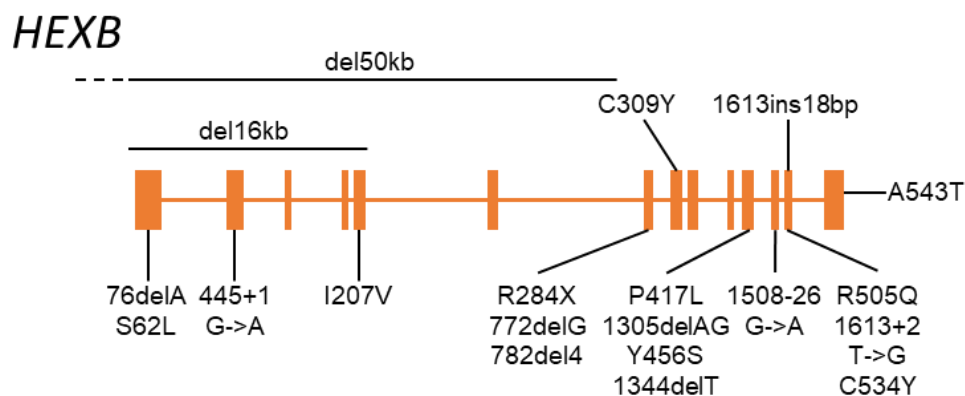


Figura 8. Mutacions al gen *HEXB*. Esquema de les mutacions actualment identificades al gen *HEXB*. Les caixes sòlides representen els 14 exons del gen (no estan representats a escala real) i les línies indiquen l'exó on es localitzen les mutacions o bé el que està més proper. Els límits de les deleccions no estan col·locats de forma precisa. La línia discontinua representa el límit 5' no definit de la delecció de 50 kb. Adaptada de (Triggs-Raine, 2001).

2.3.5. Correlació genotip-fenotip

La gravetat de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff es correlaciona directament amb el nivell residual d'activitat HEXA ($\alpha\beta$), ja que aquesta determinarà la capacitat de catabolitzar el gangliòsid GM2 al SNC i als òrgans i teixits perifèrics. En aquestes malalties, s'han pogut establir diferents correlacions entre el genotip i la gravetat del fenotip a la majoria de les mutacions identificades als gens *HEXA* i *HEXB*. Aquestes correlacions són senzilles, ja que el fenotip ve determinat per la mutació menys severa. Totes les mutacions que porten a una absència completa d'activitat HEXA, entre les quals s'inclouen les deleccions grans i petites que produeixen un canvi en el marc de lectura i les mutacions de *splicing*, s'associen amb el fenotip agut infantil i amb la mort primerenca. En canvi, comença a sorgir un ampli espectre de fenotips de la malaltia a causa de les mutacions puntuals, ja que poden dur a una alteració d'un aminoàcid amb una funció essencial a la proteïna o tot el contrari. Tot i això, si es troba en homozigosi és senzill, ja que la gravetat del fenotip del pacient serà a causa d'aquesta mutació (Triggs-Raine, 2001).

La majoria de les mutacions identificades al gen *HEXA* estan associades a un fenotip agut de la malaltia de Tay-Sachs, tot i que s'han identificat tres mutacions associades a formes més lleus de la malaltia, la Gly250Asp, l'Arg499His i l'Arg504His (Paw, 1990b; Trop, 1992). La forma crònica de la malaltia està associada a sis mutacions: Tyr180His, Lys197Thr, Arg252His, Gly269Ser, 658del3 i Val139Met, sent la Gly269Ser la mutació més comuna en pacients crònics (Navon, 1990). Totes les mutacions causants de la malaltia de Tay-Sachs estan descrites a la Taula 3.

Taula 3. Descripció dels al·lels mutants al gen *HEXA* identificats als pacients de Tay-Sachs.

Mutació del gen	Localització	Resultat esperat	Fenotip	Origen	Referència
Del7.6kb	5' del gen fins intró-1	No mRNA	Agut	Franco-canadenc	Myerowitz et al., 1986; Myerowitz et al., 1987
1A→G	Exó 1	Met1Val	Agut	Afroamericà	Mules et al., 1992b
2T→C	Exó 1	Met1Thr	Subagut sever	Anglaterra	Harmon et al., 1993
73C→T	Exó 1	Pro25Ser	Subagut sever	Anglaterra	Harmon et al., 1993
78G→A	Exó 1	Trp26Stop	Agut	Anglaterra, Israel	Drucker et al., 1993; Triggs-Raine et al., 1991
116T→G	Exó 1	Leu39Arg	Agut	Polònia	Akli et al., 1993a
346+1G→C	Intró-2	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Alemanya, Irlanda, Anglaterra	Triggs-Raine et al., 1991
346+1G→A	Intró-2	<i>Splicing</i> anormal	Agut	França	Akli et al., 1991
380T→G	Exó 3	Leu127Arg	Agut	Itàlia	Akli et al., 1993a
409C→T	Exó 3	Arg137Stop	Agut	Franco-canadenc, França, Irlanda	Akli et al., 1991; Mules et al., 1992b
412+1G→T	Intró-3	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Japó	Tanaka et al., 1994
423delTT	Exó 4	Canvi de marc de lectura	Agut	França	Akli et al., 1993a
436delG	Exó 4	Canvi de marc de lectura	Agut	Afroamericà	Mules et al., 1992b
459+5G→A	Intró-4	<i>Splicing</i> anormal	Agut	França	Akli et al., 1991
460-1G→T	Intró-4	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Afroamericà	Mules et al., 1992b
477delTG	Exó 5	Canvi de marc de lectura	Agut	Anglaterra	Triggs-Raine et al., 1991
496C→G	Exó 5	Arg166Gly	Subagut sever	Síria	Peleg et al., 1995
498delC	Exó 5	Canvi de marc de lectura	Subagut sever	Síria	Peleg et al., 1995
508C→T	Exó 5	Arg170Trp	Agut	Franco-canadenc, Itàlia	Fernandes et al., 1992; Triggs-Raine et al., 1995, 1991
509G→A	Exó 5	Arg170Gln	Agut	Japó, Escòcia, població jueva del Marroc	Akli et al., 1993a; Drucker et al., 1992; Nakano et al., 1990)
532C→T	Exó 5	Arg178Cys	Agut (variant B1)	Txecoslovàquia	Tanaka et al., 1990a
533G→A	Exó 5	Arg178His	Subagut sever o subagut (variant B1)	Portugal i divers	Kytzia et al., 1983; Ohno et al., 1988a; Rosario et al., 1991; Tanaka et al., 1988, 1990a
533G→T	Exó 5	Arg178Leu	Agut (variant B1)	Anglaterra	Triggs-Raine et al., 1991
538T→C	Exó 5	Tyr180His	Crònic	Jueus Asquenazita	de Gasperi et al., 1996
540C→G	Exó 5	Tyr180Stop	Agut	Jueus del Marroc	Drucker et al., 1992
547insA	Exó 5	Canvi de marc de lectura	Agut	Xina	Akalin et al., 1992
570G→A	Exó 5	<i>Splicing</i> anormal	Subagut sever	Tunísia	Akli et al., 1990
570+1G→A	Intró-5	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Turquia	Özkara et al., 1995
571-1G→A	Intró-5	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Japó	Tanaka et al., 1993

k574G→C	Exó 6	Val190Leu	Agut	Alemanya, Romania	Ainsworth et al., 1992; Gordon et al., 1988; Hou et al., 1996
598G→A	Exó 6	Val200Met	Agut	Alemanya, Romania	Ainsworth et al., 1992; Gordon et al., 1988; Hou et al., 1996
590A→C	Exó 6	Lys197Thr	Crònic	Holanda	Akli et al., 1993a
611A→G	Exó 6	His204Arg	Agut	Alemanya	Akli et al., 1993a
629C→T	Exó 6	Ser210Phe	Agut	Algèria, Nord d'Àfrica	Akli et al., 1991; Poenaru et al., 1994
632T→C	Exó 6	Phe211Ser	Agut	Itàlia	Akli et al., 1993a
672+1G→A	Intró-6	<i>Splicing</i> anormal	Subagut, Crònic	Amèrica	Akli et al., 1993a
739C→T	Exó 7	Arg247Trp	Pseudo-deficiència	Divers	Kaback et al., 1993; Mules et al., 1992b; Tomczak et al., 1993; Triggs-Raine et al., 1995, 1992
745C→T	Exó 7	Arg249Trp	Pseudo-deficiència	Divers	Cao et al., 1993; Kaback et al., 1993; Triggs-Raine et al., 1995, 1991
749G→A	Exó 7	Gly250Asp	Subagut	Líban	Hechtman et al., 1989; Trop et al., 1992
755G→A	Exó 7	Arg252His	Crònic	Portugal	Ribeiro et al., 1996
772G→C	Exó 7	Asp258His	Agut (variant B1)	Escòcia	Bayleran et al., 1987; Fernandes et al., 1992
805G→A	Exó 7	Gly269Ser	Crònic	Divers	D'azzos et al., 1984; Navon et al., 1989, 1990; Paw et al., 1989
805+1G→A	Intró-7	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Franco-canadenc	Hechtman et al., 1992; Triggs-Raine et al., 1995, 1991
805+1G→C	Intró-7	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Portugal	Ribeiro et al., 1995
902T→G	Exó 8	Met301Arg	Agut	Iugoslàvia	Akli et al., 1993a
910del3	Exó 8	ΔPhe304	Agut	Jueus del Marroc, França, Itàlia, Portugal	Akli et al., 1991; Drucker et al., 1992b; Navon et al., 1991; Poenaru et al., 1994
927delCT	Exó 8	Canvi de marc de lectura	Agut	Antiga Escandinàvia	Fernandes et al., 1992
958del3	Exó 8	ΔGly320	Subagut sever	Irlanda	Mules et al., 1992b
986+3A→G	Intró-8	<i>Splicing</i> anormal	Subagut sever	Alemanya, Hongria, Irlanda	Richard et al., 1995
987G→A	Exó 9	Trp329Stop	Subagut sever	Alemanya, Anglaterra	Mules et al., 1992b
1003A→T	Exó 9	Ile335Phe	Afectació prenatal	No jueu	Tomczak et al., 1994
1039del18	Exó 9	Inserció de 6 aminoàcids	Afectació prenatal	Jueus Asquenazita	Tomczak et al., 1994
1073+1G→A	Intró-9	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Divers, origen celta	Akerman et al., 1992; Akli et al., 1993b; Landels et al., 1992, 1993; Mules et al., 1992a
1074-8del5	Intró-9	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Polònia	Triggs-Raine et al., 1991
1074-1G→T	Intró-9	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Irlanda, França	Brown et al., 1995
1171G→A	Exó 11	Val391Met	Crònic	Grècia	Navon et al., 1995
1176G→A	Exó 11	Trp392Stop	Agut	Jueus Asquenazita	Shore et al., 1992
1177C→T	Exó 11	Arg393Stop	Agut	França, Turquia	Akli et al., 1991; Özkara et al., 1995b
1182delG	Exó 11	Canvi de marc de lectura	Agut	No jueu	Tomczak et al., 1994
1260G→C	Exó 11	Trp420Cys	Agut	Alemanya	Tanaka et al., 1990b

1278ins4	Exó 11	Canvi de marc de lectura	Agut	Divers	Corthorn et al., 1991; Myerowitz et al., 1988; Paw et al., 1988
1360G→A	Exó 12	Gly454Ser	Agut	Itàlia	Akli et al., 1993a
1373G→A	Exó 12	Cys458Tyr	Agut	Japó	Tanaka et al., 1994
1421+1G→C	Intró-12	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Jueus Asquenazita	Arpaia et al., 1988; Myerowitz et al., 1988; Ohno et al., 1988b
1444G→A	Exó 13	Glu482Lys	Agut	Itàlia, Xina	Nakano et al., 1988; Proia et al., 1982
1451T→C	Exó 13	Leu484Pro	Agut	Japó	Tanaka et al., 1994
1453T→C	Exó 13	Trp485Arg	Agut	Xina	Akalin et al., 1992
1495C→T	Exó 13	Arg499Cys	Agut	Europa	Akli et al., 1993a; Mules et al., 1992a
1496G→A	Exó 13	Arg499His	Subagut	Europa	Akli et al., 1993a; Paw et al., 1990b; Triggs-Raine et al., 1991
1510delC	Exó 13	Canvi de marc de lectura	Agut	Itàlia	Lau et al., 1989; Zokaeem et al., 1987
1510C→T	Exó 13	Arg504Cys	Agut	Divers	Akli et al., 1991, 1993c; Paw et al., 1991; Tanaka et al., 1994
1511G→A	Exó 13	Arg504His	Subagut	Divers	Akli et al., 1993a; Boustany et al., 1991; Paw et al., 1990b; Tanaka et al., 1994

Adaptada de(Triggs-Raine, 2001).

En el cas de la malaltia de Sandhoff, existeixen poques mutacions que s'han associat amb el fenotip moderat/crònic de la malaltia. Dues d'elles, les mutacions puntuals 1514G→A i la 1627G→A, són properes a l'extrem C-terminal de la subunitat β i estan associades amb una HEXB termolàbil (Bolhuis, 1993; de Gasperi, 1995). Per altra banda, una altra mutació puntual, la 1252C→T (Pro417Leu), té com a resultat una malaltia amb un rang molt ampli de severitat (Wakamatsu, 1992). A més a més, hi ha dues altres mutacions (1508-26G→A i 1613ins18bp) que han estat correlacionades amb un rang molt variable de fenotips incloent, fins i tot, la pseudo-deficiència de l'enzim (Dlott, 1990; Mitsuo, 1990; Nakano, 1989). En els dos casos, la subunitat β té un defecte en el plegament que impedeix el seu processament correcte; tot i això, es dona una petita porció de *splicing* correcte que permet la formació d'HEXA funcional en baixes quantitats (Triggs-Raine, 2001). Totes aquestes mutacions, entre d'altres, estan descrites a la Taula 4.

Taula 4. Mutacions al gen *HEXB* causants de la malaltia de Sandhoff i les seves variants

Mutació del gen	Localització	Resultat esperat	Fenotip	Origen	Referència
del16kb	Del promotor al intró-5	No mRNA	Agut	França, altres	Neote et al., 1990
del150kb	5' del promotor a intró-6	No mRNA	Agut	França, altres	Zhang et al., 1995
76delA	Exó 1	Canvi de marc de lectura	Agut	Maronites de Xipre	Hara et al., 1994
185C→T	Exó 1	Ser62Leu	Agut	Maronites de Xipre	Zhang et al., 1995
445+1G→A	Intró-2	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Argentina	Brown et al., 1992; Kleiman et al., 1994b; Kremer et al., 1985
619A→G	Exó 5	Ile207Val	Polimorfisme benigne	Argentina	Banerjee et al., 1991, 1994; Redonnet-Vernhet et al., 1996
772delG	Exó 7	Canvi de marc de lectura	Agut	Caucàsics, Índia	McInnes, 1992b; O'Dowd, 1986; Zhang, 1994
782del4	Exó 7	Canvi de marc de lectura	Agut	Argentina	Brown et al., 1992; Kleiman et al., 1994
850C→T	Exó 7	Arg284Stop	Agut	Argentina	Zhang et al., 1994
926G→A	Exó 8	Cys309Tyr	Crònic	Itàlia	Gomez-Lira et al., 1995
1252C→T	Exó 11	Pro417Leu (afecta l' <i>splicing</i>)	Subagut/ crònic	Japó, Itàlia, França, Canadà	Gomez-Lira et al., 1995; McInnes et al., 1992b; Wakamatsu et al., 1992
1305delAG	Exó 11	Canvi de marc de lectura	Agut	Caucàsics, Índia	(McInnes, 1992b; Zhang, 1994)
1344delT	Exó 11	Canvi de marc de lectura	Agut	Caucàsics, Índia	Zhang et al., 1994
1367A→C	Exó 11	Tyr456Ser	Segurament agut	Caucàsics, Índia	Banerjee et al., 1991, 1994
1508-26G→A	Intró-12	Inserció de 8 aminoàcids degut a un error de <i>splicing</i>	Subagut	Caucàsics, Índia	Dlott et al., 1990; Mitsuo et al., 1990; Nakano et al., 1989
1514G→A	Exó 13	Arg505Gln	Crònic	Caucàsics, Índia	Bolhuis et al., 1987, 1993; Oonk et al., 1979
1613ins18bp	Intró-13/ Exó14	Inserció de 6 aminoàcids	Asimptomàtic	França	Dlott et al., 1990; Dreyfus et al., 1977
1601G→A	Exó 13	Cys534Tyr	Agut	Japó	Kuroki et al., 1995
1613+2T→G	Intró-13	<i>Splicing</i> anormal	Agut	Japó	Gomez-Lira et al., 1995
1627G→A	Exó 14	Ala543Thr	Crònic	Jueus orientals	de Gasperi et al., 1996b

Adaptada de(Triggs-Raine, 2001).

2.4. Fisiopatologia de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

A conseqüència de les mutacions a les subunitats de la β -hexosaminidasa, els gangliòsids GM2 s'acumulen progressivament als lisosomes de diversos teixits i òrgans, principalment a l'encèfal, dels pacients Tay-Sachs i Sandhoff (Toro, 2021). A part de l'acumulació del gangliòsid GM2, també s'han observat altres acumulacions secundàries, com els fosfolípids, els cerebròsids, l'esfingomielina, el colesterol, els èsters de colesterol, entre d'altres molècules (Walkley, 2009). Com que el lisosoma té una funció fonamental en la degradació de diverses macromolècules i orgànuls, el seu deteriorament afecta l'homeòstasi cel·lular amb un impacte negatiu en la fisiologia global dels teixits (Darios, 2020). A més a més, s'han trobat anticossos contra els gangliòsids GM2 al sèrum i al SNC en el model murí de la malaltia de Sandhoff (Yamaguchi, 2004). Aquest fet suggereix que l'acumulació del gangliòsid GM2 podria promoure la disrupció d'aquests orgànuls, alliberant els gangliòsids i totes les molècules acumulades del seu interior, fenomen que també s'ha descrit per a algunes MPS (Parker, 2019). A l'encèfal i al plasma dels pacients i animals model de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, també s'ha trobat el metabòlit lyso-GM2, que presumptament té propietats tòxiques al teixit neural (Kodama, 2011).

La mort neuronal s'ha proposat com un mecanisme important que intervé en la fisiopatologia de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. Els primers estudis a l'encèfal i la medul·la espinal a partir de mostres d'autòpsia de pacients amb la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff van revelar un augment del DNA fragmentat, suggerint que l'apoptosi podria contribuir en el procés neurodegeneratiu d'aquests pacients (Huang, 1997). Tot i que la via precisa que explica l'augment de l'apoptosi neuronal no s'ha resolt completament, s'ha demostrat que el gangliòsid GM2 pot produir estrès del reticle endoplasmàtic que podria induir l'apoptosi (Ginzburg, 2008). Per altra banda, alguns estudis han suggerit que el gangliòsid GM2 promou l'atròfia de les neurites i la mort de les cèl·lules a través de l'apoptosi mitjançada per la quinasa del reticle endoplasmàtic similar a la proteïna quinasa R (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*, PERK) amb la posterior activació de la proteïna homologa a la proteïna d'unió al potenciador CCAAT (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein*, CHOP), que és un inductor de l'apoptosi mitocondrial (Hu, 2019; Virgolini, 2019). Aquests resultats proposen que l'àcid siàlic del gangliòsid GM2 pot tenir propietats pro-apoptòtiques. No obstant això, l'ús d'un inhibidor de PERK no va abolir completament l'apoptosi, cosa que indica que existeixen altres mecanismes que podrien estar implicats en la mort neuronal a les gangliosidosis GM2 (Virgolini, 2019).

L'activació i la proliferació de la micròglia s'ha descrit àmpliament en els models de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff. A més, l'astrocitosi també pot tenir un paper important en les gangliosidosis GM2, fins i tot, en estats asimptomàtics de les malalties. Ogawa *et al.* Van demostrar en ratolins de la malaltia Sandhoff que els astròcits s'activen per un mecanisme depenent del receptor Fc de la cadena γ (*Fc receptor gamma-chain*, FcR γ) (Ogawa, 2017). En activar-se, l'astròcit secreta quimiocines, la proteïna quimioattractant de monòcits tipus 1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, MCP1) i la quimiocina C-X-C tipus 10 (*C-X-C motif chemokine 10*, CXCL10), que es correlacionen amb una robusta activació de la micròglia i la invasió de cèl·lules immunitàries perifèriques al SNC. Aquesta activació d'astròcits podria conduir a la degeneració i la mort dels oligodendròcits mielinitzats, promovent la desmielinització activa que s'observa freqüentment a les formes infantils de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff (Domingues, 2016).

En conclusió, aquestes investigacions posen de manifest que la interacció fonamental entre la micròglia i els astròcits en la resposta inflamatòria observada a les dues malalties podria ser la conseqüència funcional d'una lesió neuronal, a causa de l'acumulació dels gangliòsids GM2, i podria contribuir al procés neurodegeneratiu (Leal, 2020). Els estudis realitzats per Jeyakumar *et al.* amb un model de ratolí de la malaltia Sandhoff van demostrar que, a mesura que la malaltia progressa, apareixen símptomes com el tremolor del cap, la disfunció motora i la paràlisi de les extremitats posteriors. A més, s'observa augment d'algunes citocines pro-inflamatòries, com el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alfa*, TNF α), entre d'altres (Jeyakumar, 2003). Aquests descobriments suggereixen que l'activació innata del sistema immune al SNC es podria produir, almenys en part, en resposta a la mort neuronal.

La neurodegeneració a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff també pot ser deguda a alteracions en l'homeòstasi del ferro. Al cervell dels ratolins de la malaltia de Sandhoff, s'ha observat una reducció progressiva del ferro que sembla que correlaciona amb la neurodegeneració. També, es va detectar un augment dels nivells d'hepsidina i d'interleucina 6 (IL-6), reguladors clau de l'homeòstasi del ferro, i una reducció de la transferrina, la principal proteïna transportadora del ferro i necessària per adquirir el ferro de la circulació. Després de l'administració exògena de ferro als ratolins Sandhoff, es va observar un increment la supervivència d'un 38%, un endarreriment en l'aparició de la malaltia i la preservació de la funció motora als ratolins tractats (Jeyakumar, 2009).

Diversos exàmens patològics en pacients de Tay-Sachs mostren que, a causa de la gliosi, el pes i el volum de l'encèfal augmenta durant el segon any de vida

(Fukumizu, 1992). Freqüentment, també es detecta la presència de degeneració quística de la substància blanca cerebral, juntament amb l'atròfia dels hemisferis cerebel·losos; una reducció del número de neurones i una inflamació crònica de les neurones restants a causa del material acumulat; i un augment de la mida de les cèl·lules glials. Als teixits perifèrics, el fetge, la melsa i el pulmó s'hi poden trobar macròfags carregats de lípids (Fukumizu, 1992).

2.5. Descripció clínica de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

Hi ha un ampli espectre de presentacions clíniques de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. Clàssicament, es classifiquen en: 1) les formes agudes, infantils o clàssiques; 2) les juvenils, subagudes o infantils tardanes; i 3) les d'aparició tardana, adultes o cròniques. Tot i això, realment es tracta més aviat d'un espectre continu de les característiques clíniques de les malalties (Breiden, 2019).

2.5.1 Malalties de Tay-Sachs i Sandhoff infantils

Les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff es presenten amb més freqüència en la seva forma infantil i, pràcticament, són clínicament indistingibles entre elles. Generalment, els nadons amb una d'aquestes dues malalties infantil semblen normals al néixer. El primer signe de les malalties és una debilitat motora lleu que comença al voltant del 3-6 mesos d'edat. En una fase inicial, també s'observa una resposta exagerada al soroll o hiperacúsia. Les malalties segueixen amb una regressió i pèrdua de les habilitats psicomotrius ja adquirides i, al cap de 8-10 mesos, la regressió de les habilitats es produeix més ràpidament. Amb el pas del temps, el nadons es tornen menys sensible als pares i al seu entorn, i abans dels 10 mesos d'edat, ja hi ha una debilitat progressiva i hipotonia amb una pèrdua de la motricitat, tal com asseure's i gatejar (Jarnes Utz, 2017). L'examen oftalmològic sovint revela taques maculars de color vermell cirera i la visió i l'oïda es deterioren progressivament (Johnson, 1981). La majoria dels pacients tant de Tay-Sachs com de Sandhoff pateixen restrenyiment i una salivació o secreció excessiva. Les convulsions acostumen a aparèixer uns mesos després de l'inici dels símptomes i la macrocefàlia, deguda a la gliosis cerebral reactiva, comença als 18 mesos d'edat. El deteriorament ràpid i progressiu condueix a una rigidesa, dificultat per empassar, augment de l'activitat convulsiva i, finalment, s'arriba a un estat vegetatiu (Pampiglione, 2008). Finalment, els pacients tenen una supervivència mediana de 43 mesos, amb un interval de 33 a 67 mesos d'edat. La causa més freqüent de mort és la insuficiència respiratòria associada a la pneumònia per aspiració (Jarnes Utz, 2017).

Els estudis de neuroimatge mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN) van evidenciar un engrandiment del nucli caudat a mesura que avança la malaltia tant de Tay-Sachs com de Sandhoff (Mittal, 2016). Els estudis volumètrics mostren un increment del volum del cervell i el cerebel, alhora que es detecta una disminució de les subestructures cerebrals més petites, com el cos callós, el caudat i el putamen (Nestrasil, 2018). En les fases més avançades de les malalties, hi ha una atròfia cerebral evident i hipomielinització (Jarnes Utz, 2017).

2.5.2. Malalties de Tay-Sachs i Sandhoff juvenils

En el cas de la forma juvenil de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, els pacients segueixen presentant una simptomatologia pràcticament idèntica, que es caracteritza principalment amb alteracions de la marxa, incoordinació, problemes de parla, pèrdua de visió i d'oïda progressius i retard del desenvolupament entre 2 i 10 anys. Les capacitats motrius, de parla i cognitives disminueixen i l'espasticitat i les convulsions solen estar presents al final de la primera dècada de vida. Durant el transcurs d'ambdues malalties, es pot desenvolupar una atròfia òptica i retinitis pigmentosa, i només 1 de cada 15 pacients presenta una taca de color vermell cirera a l'ull (Maegawa, 2006). Aproximadament, la meitat dels individus afectats per la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff desenvolupen problemes de comportament, alguna patologia psiquiàtrica, disfàgia, debilitat distal, incontinència, convulsions i un escàs augment del pes (Maegawa, 2006; Toro, 2020). L'edat d'inici de la disfàgia i la incontinència es detecta abans als pacients afectats per la malaltia de Tay-Sachs que als de Sandhoff; mentre que el desgast muscular, els problemes de restrenyiment i la diarrea i els problemes del son es troben més freqüentment a la malaltia de Sandhoff. El 53% dels pacients d'ambdues malalties van presentar atròfia cerebel·losa o cerebral a les imatges de l'encèfal per RMN. Generalment, als 10-15 anys es troben en un estat vegetatiu amb rigidesa que, després de poc temps, provoca la mort, normalment per infecció respiratòria. La taxa de progressió de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff oscil·la entre més de 2 anys i més enllà d'una dècada de vida, amb una mediana de supervivència de 14,5 anys (Maegawa, 2006).

2.5.3. Malalties de Tay-Sachs i Sandhoff d'inici tardà

Finalment, les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff d'aparició tardana tenen un inici clínic de la patologia que pot succeir des de la infància fins a l'edat adulta, amb una edat mediana d'inici de 21 anys, tot i que es poden haver observat símptomes motors subtils durant la infància. De nou, es tracta d'una simptomatologia pràcticament indistingible entre les dues malalties. Les principals diferències entre les formes juvenils i les adultes són l'edat d'inici d'ambdues malalties i l'impacte a la intel·ligència, que és menys freqüent en la variant crònica o adulta (Maegawa, 2006). Un estudi d'història natural de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff va revelar que les quatre manifestacions més típiques són: (i) la malaltia de la neurona motora inferior, que presenta debilitat de les extremitats inferiors i progressa cap a debilitat a les extremitats superiors; (ii) atàxia cerebel·losa; (iii) psicosi i/o (iv) trastorn sever de l'estat d'ànim, aquest últim símptoma clínic només s'observa a la malaltia de Tay-Sachs (Masingue, 2020).

El patró de debilitat més característic en aquesta forma de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff és que el múscul psoes és el primer i el més afectat a les extremitats inferiors, provocant dificultats per pujar escales; mentre que el tríceps i el interossis són els més afectats a les extremitats superiors (Masingue, 2020). Les biòpsies musculars mostren atròfia de la denervació, tot i que les velocitats de conducció dels nervis solen ser normals (Federico, 1991). La neuropatia autònoma amb acroparestèsies també s'ha descrit com una possible característica d'ambdós trastorns (Chow, 2001). El tartamudeig aïllat és, a vegades, l'única manifestació inicial de la malaltia de Tay-Sachs d'aparició tardana, presentant-se diversos anys abans de desenvolupar altres manifestacions clíniques (Shapiro, 2009). La meitat dels individus afectats tant per la malaltia de Tay-Sachs com per la de Sandhoff han d'utilitzar cadira de rodes 20 anys després de l'aparició dels primers símptomes (Masingue, 2020).

2.6. Diagnòstic de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

El diagnòstic dels pacients amb la malaltia de Tay-Sachs o Sandhoff comença amb el reconeixement de les característiques clíniques d'aquests trastorns, que com ja s'ha vist són pràcticament indistingibles. També s'ha de tenir en compte que les presentacions clíniques de les dues malalties poden variar en funció de l'edat d'inici de la malaltia, les formes d'inici adult són menys progressives i més difícils de diagnosticar (Hall, 2014).

El diagnòstic específic tant de la malaltia de Tay-Sachs com de Sandhoff requereix la determinació de les activitats HEXA i HEXB mitjançant l'ús de substrats específics, com el 4-metilumbel·liferil-N-acetilglucosaminida (MUG), que permet mesurar l'activitat tant d'HEXA ($\alpha\beta$) com d'HEXB ($\beta\beta$) i d'HEXS ($\alpha\alpha$), mentre que si s'utilitza un substrat sulfatat, el 4-metilumbel·liferil-N-acetilglucosaminida-6-sulfat (MUGS), es mesura l'activitat HEXA ($\alpha\beta$) i HEXS ($\alpha\alpha$) (Bayleran, 1984). Malgrat que l'activitat es pot avaluar en fluids biològics, cèl·lules, teixits i taques de sang seca, l'estàndard més usat per al diagnòstic és la mesura de l'activitat enzimàtica en leucòcits, fibroblasts o vellositats coriòniques (Hall, 2014). No obstant això, l'assaig d'activitat de la β -hexosaminidasa no permet la identificació dels portadors asimptomàtics, per als quals es requereix un diagnòstic molecular. El diagnòstic molecular es realitza mitjançant la seqüenciació dels gens *HEXA* i *HEXB* que permet confirmar el diagnòstic tant de la malaltia de Tay-Sachs com de Sandhoff (Zhang, 2019).

Generalment, l'inici i la gravetat de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff es correlaciona inversament amb l'activitat catabòlica residual d'HEXA. Tot i que els pacients amb la forma infantil tenen una activitat enzimàtica absent o molt baixa (<5%), els pacients amb un inici juvenil o adult de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff poden tenir activitats enzimàtiques d'entre el 5 i el 10%. En aquest sentit, s'ha proposat que un 10% de l'activitat enzimàtica normal d'HEXA podria evitar tant la malaltia de Tay-Sachs com la de Sandhoff, basant-se en els estudis que descriuen que un 10-15% d'activitat HEXA és capaç de degradar el gangliòsid GM2 (Leal, 2020).

2.7. Models animals de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

Per l'estudi de les bases genètiques i metabòliques d'una determinada malaltia i l'assaig de possibles aproximacions terapèutiques, és necessari l'ús de models animals. Per les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, hi ha diferents models animals que han estat generats per manipulació genètica o bé han aparegut de forma natural a causa de mutacions espontànies. En aquests darrers casos, només s'han generat colònies del model felí i l'oví per a l'estudi de la fisiopatologia o el desenvolupament de nous tractaments en models animals grans.

2.7.1. Models murins

En els últims anys, s'han desenvolupat diferents models murins de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. Per una banda, s'han generat i caracteritzat tres models murins diferents de la malaltia de Tay-Sachs (Cohen-Tannoudji, 1995; Phaneuf, 1996; Yamanaka, 1994) i, per l'altra, dos models murins de la malaltia de Sandhoff (Phaneuf, 1996; Sango, 1995).

Per a generar el model murí de la malaltia de Tay-Sachs, es va introduir un casset de resistència a la neomicina en cèl·lules mare embrionàries i es van generar tres knock-out (KO) diferents: en dos casos, la inserció va ser dins l'exó 8 del gen *HexA* (Cohen-Tannoudji, 1995; Yamanaka, 1994) i, en el tercer model, la inserció va ser a l'exó 11 (Phaneuf, 1996). En els models murins de la malaltia Sandhoff, l'estratègia utilitzada també es va basar en la introducció d'un casset de resistència a la neomicina: en un model, la inserció va ser a l'exó 13 del gen *HexB* (Sango, 1995) i, en l'altre, a l'exó 2 (Phaneuf, 1996).

A diferència de les malalties humanes, els ratolins models de la malaltia de Tay-Sachs, en comparació als de Sandhoff, presenten uns fenotips dràsticament diferents, tant pel que fa a la severitat com a la progressió de la malaltia. Els ratolins Tay-Sachs són completament asimptomàtics i no expressen els símptomes neurològics característics de la malaltia humana, tot i que es detecta l'acumulació del gangliòsid GM2 en determinades regions del SNC (Phaneuf, 1996; Taniike, 1995). Es pot induir un fenotip equivalent a la forma adulta de la malaltia de Tay-Sachs a les femelles que han tingut 4 camades abans d'un any d'edat. Aleshores, el 100% d'aquestes femelles presenten símptomes com un augment del gangliòsid GM2 a l'encèfal, lordosi, tremolor, atàxia i debilitat/paràlisi a les extremitats posteriors entre els 18 i els 24 mesos d'edat (Jeyakumar, 2002).

En canvi, els diferents models de ratolins Sandhoff desenvolupen trastorns neurològics greus. En primer lloc, l'acumulació patològica del gangliòsid GM2 i el gangliòsid asialo-GM2 (GA2) a pràcticament tot el SNC provoca els símptomes neurològics, que ja es detecten al voltant dels 3 mesos d'edat, com per exemple, l'espasticitat, la debilitat muscular, la rigidesa, el tremolor i l'atàxia. Abans de l'inici de la mort neuronal, s'observa una intensa reacció de la immunitat innata caracteritzada per l'augment de les citocines pro-inflamatòries, de la micròglia activada, de monòcits infiltrats i d'una forta astrogliosi. A les últimes etapes de la malaltia, es detecta la presència de neurones apoptòtiques al SNC, especialment a la medulla espinal, al tàlem i al tronc cerebral, i finalment, els ratolins moren al voltant dels 4 mesos d'edat (Phaneuf, 1996; Sango, 1995).

La raó per la qual s'ha detectat una diferència tan evident en el fenotip entre els models murins de la malaltia Tay-Sachs i de Sandhoff és l'existència d'una via alternativa de *by-pass* de la degradació del gangliòsid GM2 en els ratolins (Figura 9). En aquesta via, una sialidasa accepta el GM2 com a substrat per tal de convertir-lo en GA2, que posteriorment la isoforma HEXB ($\beta\beta$) juntament amb l'acció del GM2A és capaç de degradar-lo (Figura 9). En el cas dels ratolins Sandhoff, al no tenir ni la isoforma HEXB ($\beta\beta$) ni l'HEXA ($\alpha\beta$), no poden degradar ni el GM2 ni el GA2 (Figura 9) (Kolter, 1998). En humans, aquesta via de *by-pass* no funciona correctament, ja que el GM2A és molt ineficient en estimular la hidròlisi del GA2 (Bertoni, 1999).

Per evitar el *by-pass* en la degradació del gangliòsid GM2 a través de la sialidasa codificada pel gen *Neu3*, es va generar un model de ratolí amb la deficiència del gen *HexA* i *Neu3* per tal d'obtenir un model animal que recapitulés les característiques clíniques de la malaltia de Tay-Sachs (Seyrantepe, 2018). En aquest model murí, es va detectar una acumulació anormal del gangliòsid GM2 a l'encèfal, amb una neurodegeneració progressiva, una evident neuroinflamació, diverses anomalies en l'estructura òssia i alteracions neurològiques, com ara l'atàxia, el tremolor i un moviment lent. Finalment, aquests ratolins afectats per la malaltia de Tay-Sachs moren entre els 1,5 i els 4,5 mesos d'edat (Seyrantepe, 2018).

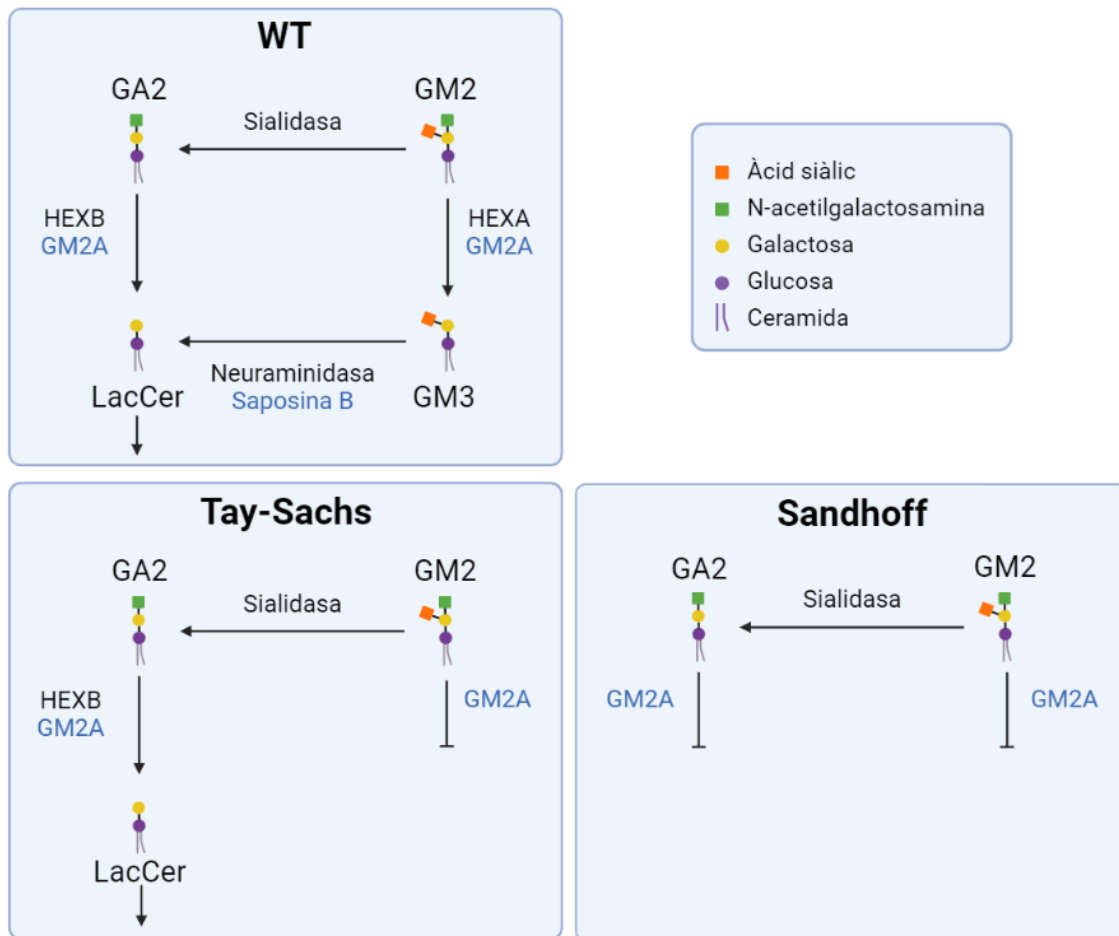


Figura 9. Vies de la degradació del gangliòsid GM2 en els models murins de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. Els noms dels enzims estan indicats en negre i els de les proteïnes activadores, en blau. En els ratolins WT, el gangliòsid GM2 es degrada per la via catabòlica principal per l'acció de l'enzim HEXA ($\alpha\beta$), però també per la via catabòlica de la sialidasa (o *by-pass*) on es degrada a GA2 i, amb l'ajuda de l'enzim HEXB ($\beta\beta$), es converteix en LacCer. Al model murí de la malaltia de Tay-Sachs, només funciona la via del *by-pass*, gràcies a la síntesi normal de l'enzim HEXB que permet, d'aquesta manera, la degradació del gangliòsid GM2. En el cas del ratolí Sandhoff, les dues vies del catabolisme del gangliòsid GM2 dels animals WT (la principal i el *by-pass*) no són funcionals, ja que no tenen ni la isoforma HEXB ($\beta\beta$) ni l'HEXA ($\alpha\beta$). Adaptada de(Kolter, 1998).

Finalment, també es va desenvolupar un ratolí doble KO pels gens *HexA* i *HexB*, per tant, és un animal deficient en els tres isoenzims: HEXA, HEXB i HEXS. Aquest model animal presenta les característiques típiques de les gangliosidosis GM2, com l'acumulació dels gangliòsids GM2 i GA2 a l'encèfal i una severa desmielinització. Ara bé, també presenta algunes característiques fenotípiques de la mucopolisacaridosi, com el dimorfisme facial, les anomalies esquelètiques, el retard en el creixement i l'excreció de grans quantitats de GAGs a l'orina. Així doncs, un ratolí doble KO pels gens *HexA* i *HexB* no reflecteix cap malaltia humana coneguda, encara que en fibroblast pacients humans de Tay-Sachs i Sandhoff s'hagi detectat un increment dels GAGs en comparació amb els d'individus sans (Sango, 1996).

2.7.2. Model oví de la malaltia de Tay-Sachs

L'any 2010, les manifestacions clíniques de la malaltia de Tay-Sachs es van descriure en una ovella de raça Jacob, com a conseqüència d'una mutació espontània al gen *HexA*. Els estudis genètics mostren que la deficiència de l'activitat HEXA en aquests animals s'associa a una mutació puntual que provoca un canvi de base, G→C, a l'exó 11 del gen *HexA*, i dona lloc a una substitució d'una glicina per una arginina, G444R, a la subunitat α (Torres, 2010). Clínicament, aquestes ovelles pateixen atàxia, defectes propioceptius i ceguesa. A més, també es va observar una astrocitosis generalitzada, una evident microgliosi, alguns esferoides corticals dispersos i altes concentracions del gangliòsid GM2 a l'encèfal (Porter, 2011). Les característiques clíniques i bioquímiques del model d'ovella de raça Jacob de la malaltia de Tay-Sachs s'assemblen molt a la forma humana d'aparició tardana (Porter, 2011).

2.7.3. Model felí de la malaltia de Sandhoff

No s'ha descrit cap model felí de la malaltia de Tay-Sachs. Tanmateix, s'han informat de nombroses mutacions al gen *HexB* felí, causant de la malaltia de Sandhoff. L'any 1977, es va descriure una mutació genètica en gats domèstics de pèl curt. Els animals amb aquesta mutació, una inversió de 25 pb a l'extrem 3' de la seqüència codificant del gen *HexB*, tenen menys del 3% de l'activitat β -hexosaminidasa normal i un 15% dels nivells normals de proteïna (Cork, 1977; Martin, 2004). Més tard, el 1985, es va trobar una mutació, que consisteix en una supressió d'un únic parell de bases que produeix un codó *stop* prematur a l'exó 1, als gats de raça Korat derivats de Tailàndia (Neuwelt, 1985). També, en gats domèstics japonesos, s'ha detectat una substitució d'un nucleòtid que produeix un codó *stop* prematur a l'aminoàcid 223 (Hasegawa, 2007; Kanae, 2007; Yamato, 2004). Finalment, en gats birmans europeus es va trobar una deleció de 15pb a l'extrem 3' de l'intró 11 del gen *HexB*, que inclou un lloc de *splicing* (Bradbury, 2009).

De tots els gats descrits, només s'ha pogut establir una colònia, la dels gats domèstics de pèl curt. Els signes clínics d'aquests gats comencen a les 4-7 setmanes d'edat i inclouen la hipermetria, el tremolor del cap, l'atàxia i la parèsia. Durant el transcurs de la malaltia, també apareixen convulsions i, finalment, la mort es produeix al voltant dels 6 mesos d'edat (Cork, 1978; Martin, 2004; Neuwelt, 1985). Tanmateix, s'ha establert un punt final per raons humanitàries en els gats models de la malaltia de Sandhoff, com per exemple la incapacitat de mantenir-se dempeus, que es produeix de mitjana als 4,3 mesos d'edat (McCurdy, 2015; Rockwell, 2015).

2.8. Tractament per a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

Actualment, s'han provat diverses aproximacions terapèutiques per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. Encara que alguna d'aquestes opcions terapèutiques hagin arribat a fases clíniques, no n'hi ha cap que estigui aprovada comercialment per al tractament de les gangliosidosis GM2 (Leal, 2020). Així doncs, el futur pels pacients d'aquestes malalties es basa en el desenvolupament d'un tractament efectiu, juntament amb minimitzar la dificultat diagnòstica mitjançant cribratges neonatals i l'educació dels metges per tal d'aconseguir un diagnòstic precoç (Toro, 2021).

2.8.1. Tractament simptomàtic

El tractament simptomàtic es coneix com el conjunt d'estratègies que, sense corregir el defecte genètic, permeten pal·liar la simptomatologia clínica de la malaltia i millorar la qualitat de vida del pacient. Com que actualment no hi ha cap teràpia per les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, els pacients únicament poden rebre un tractament simptomàtic.

Aquest tractament és principalment de suport i està dirigit a proporcionar una nutrició i hidratació adequades, controlar les malalties infeccioses, protegir les vies respiratòries i controlar les convulsions tant en el cas de la malaltia de Tay-Sachs com en la de Sandhoff (Toro, 2020). En el cas de la forma infantil, el tractament es basa en una medicació per reduir els símptomes de la malaltia. Els anticonvulsius convencionals com les benzodiazepines, les fenitoïnes i/o els barbitúrics i fàrmacs per la rigidesa permeten controlar les convulsions (Bley, 2011). A causa de l'alt risc de patir infeccions pulmonars, els pacients d'aquestes malalties s'han de fer cures respiratòries recurrents o bé realitzar fisioteràpia toràcica o usar armilles vibradores per evitar l'acumulació de mucositat als pulmons que els podria provocar problemes de respiració (Toro, 2020). A més, també poden tenir problemes respiratoris a causa d'una broncoaspiració d'aliments o líquids que van cap als pulmons. Per aquest motiu, alguns pacients necessiten tubs d'alimentació, ja sigui un tub que vagi directament del nas a l'estómac o bé inserir quirúrgicament un tub d'esofagogastrostomia (Sun, 2021). A vegades, és necessari monitoritzar la disfunció intestinal a causa del restrenyiment, que millora amb l'ús de suavitzants de femtes, pro-cinètics, agents osmòtics o laxants (Toro, 2020). La fisioteràpia és una eina important per tal de mantenir la flexibilitat de les articulacions i preservar la capacitat de moviment tant de temps com sigui possible, com també per

reduir el dolor resultant de l'escurçament dels músculs i millorar la capacitat de tossir per reduir el risc de pneumònia (Sun, 2021; Toro, 2020)

En el cas de la forma juvenil de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, el tractament es basa en: (i) el control de les convulsions, tot i que és complicat aconseguir-ne un control complet; (ii) la millora de l'espasticitat mitjançant la realització d'estiraments, l'ús de fèrules i/o el tractament farmacològic; (iii) solucionar els problemes d'alimentació amb l'ús d'un tub gàstric; i (iv) monitoritzar i controlar la disfunció intestinal a causa del restrenyiment amb un tractament similar que a la forma infantil. A més, també es recomana un programa educatiu individualitzat a causa de la decadència cognitiva que presenten els pacients afectats per les malalties de Tay-Sachs o Sandhoff. Finalment, l'ús de la toxina botulínica específicament a les glàndules salivals pot ser una opció terapèutica pels problemes d'acumulació de saliva, tot i que aquest fàrmac es pot estendre als músculs i provocar l'empitjorament de la disfàgia. Pels problemes de baveig, es poden fer servir agents anticolinèrgics tòpics en forma de gotes (Toro, 2020).

Els individus que pateixen la forma adulta de les malalties de Tay-Sachs o Sandhoff habitualment necessiten teràpia ocupacional, fisioteràpia a causa de la debilitat i reducció de la mobilitat i teràpia vocal centrada en estratègies per reduir la velocitat de la parla. Per l'espasticitat i els tremolors, cal una farmacoteràpia dirigida a aquests símptomes sota la supervisió d'un neuròleg. A més, l'ajuda psiquiàtrica amb antidepressius o antipsicòtics és clau pel control d'aquesta simptomatologia, tot i que la resposta clínica és variable i limitada. La teràpia cognitiva conductual i l'electroconvulsiva poden ser beneficioses en alguns casos (Toro, 2020).

2.8.2. Teràpia de reducció del substrat

La teràpia de reducció del substrat (*substrate reduction therapy*, SRT) és una estratègia terapèutica basada en la inhibició parcial d'un enzim que estigui involucrat en la síntesi del substrat acumulat, que en el cas de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff és el gangliòsid GM2. Una de les molècules avaluades és l'N-butildesoxinojirimicina (NB-DNJ), també anomenat Miglustat, que es comercialitza amb el nom de Zavesca. Es tracta d'un iminosucre que inhibeix la glucosilceramida sintasa, que catabolitza el primer pas de la síntesi d'alguns glicolípidis com la glucosilceramida, l'esfingomièlina i els gangliòsids GM1 i GM2. El Miglustat és un medicament oral capaç de travessar la barrera hematoencefàlica (BHE) i arribar eficientment al SNC per alentir l'acumulació dels gangliòsids a les neurones i endarrerir el progrés dels símptomes neurològics (Platt, 2008). Aquest tractament ha demostrat certa eficàcia terapèutica en el model murí de la

malaltia de Sandhoff, on s'ha detectat un endarreriment en l'aparició dels símptomes i un increment de l'esperança de vida dels ratolins tractats (Jeyakumar, 1999). Posteriorment, l'administració oral del Miglustat en dos pacients amb la forma infantil de la malaltia de Tay-Sachs va evidenciar una concentració rellevant al líquid cefalorraquidi (LCR) i al plasma; tot i que no va aturar la progressió de la disfunció neurològica (Bembi, 2006). A un altre assaig clínic en cinc pacients tant de la malaltia de Sandhoff com la de Tay-Sachs juvenil, es van observar uns resultats similars (Maegawa, 2009).

Aquests resultats dels assajos clínics van demostrar la limitada eficàcia terapèutica de la SRT per al tractament de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff.

2.8.3. Teràpia de substitució enzimàtica

La teràpia de substitució enzimàtica (*enzyme replacement therapy*, ERT) consisteix en l'administració de l'enzim deficient causant de la malaltia per tal que sigui captat per les cèl·lules via el M6PR, present a la membrana plasmàtica. L'ERT és una opció prometedora per al tractament de la patologia somàtica de les LSD després d'una administració intravenosa, però amb un efecte més limitat pels símptomes neurològics, ja que l'enzim no travessa la BHE (Li, 2018). Actualment, el tractament amb l'ERT està clínicament aprovat per diferents LSD, com per exemple, les malalties de Gaucher, Fabry i Pompe, i la MPS I, II i VI (Garbade, 2020).

En el cas de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, el 1973 es va realitzar el primer estudi mitjançant l'administració intravenosa de la proteïna recombinant HEXA ($\alpha\beta$) en un pacient amb la malaltia de Sandhoff, on es va observar que l'enzim arribava eficientment al fetge, però no al LCR o al parènquima cerebral, fet que indica que l'enzim era incapaç de creuar la BHE (Johnson, 1973). Per superar aquesta limitació, existeixen algunes estratègies prometedores que permeten que els enzims lisosòmics puguin travessar la BHE, com per exemple, el desenvolupament de proteïnes de fusió o també anomenades cavalls de Troia moleculars (Giugliani, 2018). Aquestes proteïnes fusionades són enzims quimèrics recombinants fusionats a un anticòs monoclonal (*monoclonal antibody*, mAb), que reconeixen el receptor de la insulina humana (*human insulin receptor*, HIR) o el receptor de la transferrina (*transferrin receptor*, TfR), els quals permeten el pas de la proteïna a través de la BHE gràcies a l'endocitosi mitjançada pel receptor fusionat a la proteïna (Boado, 2019). En aquest camp, diversos estudis amb primats no humans han demostrat que l'administració intravenosa de l'HIRmAb fusionat amb l' α -iduronat-2-sulfatasa (Boado, 2014a), la sulfamidasa (Boado, 2014b) o l' α -N-acetilglucosaminidasa (Boado, 2016) pot creuar la BHE sense cap efecte secundari pel

tractament de la malaltia de Hunter, la MPSIIIA i la malaltia de Schindler. Tot i que aquestes aproximacions terapèutiques no s'han avaluat en models animals de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, es va comprovar que l'enzim HEXA fusionat amb l'HIRMAb té una activitat similar a l'enzim no fusionat, fet que suggereix que l'ús dels cavalls de Troia moleculars podria ser una alternativa per tractar les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff (Boado, 2019).

Per altra banda, l'administració de proteïnes recombinants a través de la injecció directament al LCR per via intratecal o intracerebroventricular (ICV) ha demostrat un potencial efecte terapèutic per algunes LSD amb afectació al SNC (Giugliani, 2018). Un estudi en ratolins de la malaltia de Sandhoff va revelar que l'administració ICV de l'HEXA recombinant resultava en un augment dels nivells d'activitat enzimàtica al SNC que donava lloc a un augment de la supervivència, acompanyat d'una reducció dels gangliòsids GM2 i GA2 (Tsuji, 2011). En un altre estudi amb ratolins Sandhoff, es va avaluar l'administració ICV d'un enzim HEXB quimèric, que conté la subunitat β amb sis mutacions puntuals i una seqüència parcial de la subunitat α que permet la unió dels substrats carregats negativament i el GM2A. Després del tractament, es van restablir els nivells d'activitat β -hexosaminidasa normals que va donar lloc a una reducció parcial del gangliòsid GM2 tant a l'encèfal com al fetge (Matsuoka, 2011).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'ERT administrada per via ICV podria ser una possible opció terapèutica per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. Tot i això, l'ERT presenta diversos inconvenients com: (i) les administracions repetitives a causa de la curta vida de la proteïna recombinant, (ii) l'alt cost de la teràpia i (iii) els riscos associats als dispositius intratecals permanents per realitzar les administració directament al LCR dels pacients.

2.8.4. Xaperones farmacològiques

Les xaperones farmacològiques són petites molècules que s'uneixen a una proteïna diana per tal d'estabilitzar la seva conformació nativa o afavorir el seu correcte plegament. En general, s'uneixen amb una gran afinitat i selectivitat a la proteïna diana en el reticle endoplasmàtic per tal de passar amb èxit el control de qualitat d'aquest òrganul. Posteriorment, es dissocien al lisosoma a conseqüència del pH àcid i la presència del substrat natural, que competeix amb les xaperones farmacològiques pel centre actiu. Actualment, la majoria de les xaperones farmacèutiques descrites actuen com a inhibidors competitiu (Liguori, 2020). Un dels problemes de les xaperones farmacològiques és la dependència de la seva activitat en funció de la mutació causant

de la malaltia, que limita el número de pacients amb la capacitat de respondre al tractament, que serien els que tenen una mutació que provoca problemes de plegament o de menor estabilitat de l'enzim HEXA (Boyd, 2013).

En un cribatge de 1040 fàrmacs aprovats per la FDA (*food and drug administration*), la pirimetamina (*pyrimethamine*, PYR) va ser detectat com l'inhibidor competitiu més potent per l'HEXA ($\alpha\beta$), és a dir, la xaperona farmacològica més prometedora com a nova aproximació terapèutica tant per la malaltia de Tay-Sachs com per la de Sandhoff (Maegawa, 2007). La PYR, utilitzat prèviament en el tractament de la toxoplasmosi i la malària, interfereix en la síntesi de l'àcid fòlic mitjançant la inhibició de l'enzim dihidrofolat reductasa i, a més, pot crear la BHE (Maegawa, 2007). Es va realitzar un estudi en línies cel·lulars de pacients amb la malaltia de Tay-Sachs d'aparició tardana i pacients amb la malaltia de Sandhoff tractades amb diferents dosis terapèutiques de PYR. Les cèl·lules que responien al tractament amb PYR eren les que portaven una mutació que provocava una reducció de l'estabilitat de la proteïna amb la temperatura o bé mutacions de *splicing* que feien la subunitat α menys estable (Maegawa, 2007). No obstant això, els assaigs clínics van presentar un efecte limitat de la PYR en les manifestacions del SNC de la malaltia, tot i l'augment de l'activitat enzimàtica als pacients Tay-Sachs tractats (Clarke, 2011; Osher, 2015).

Per tal d'identificar noves xaperones farmacològiques per la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, es va fer un anàlisi *in silico* d'inhibidors d'aminosucres que s'uneixen al centre actiu de l'enzim HEXA ($\alpha\beta$) (Kato, 2017). Al llarg de les simulacions d'acoblament molecular, es va predir que l'amida de la pirrolidina 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-mannitol (DMDP) era l'inhibidor competitiu més fort d'HEXA. En estudis *in vitro*, el DMDP va augmentar un 43% l'activitat intracel·lular de l'enzim HEXA als fibroblasts de pacients de la malaltia de Tay-Sachs (Kato, 2017).

Una altra possible estratègia per millorar el plegament de l'HEXA ($\alpha\beta$) mutada és l'ús de la progranulina (PGRN). La PGRN és una glicoproteïna secretada per les cèl·lules epitelials, neuronals i immunitàries que està implicada en una gran varietat de processos fisiològics i malalties, com l'embriogènesi primerenca, la proliferació cel·lular, les malalties immunes i neurodegeneratives, els processos d'inflamació, la cicatrització de ferides i la reparació de teixits (Chen, 2018; Jian, 2016). A més, la PGRN funciona com a xaperona de determinats enzims lisosòmics i la seva deficiència s'associa amb algunes LSD, particularment amb la malaltia de Gaucher (Jian, 2016). Així doncs, després d'examinar l'efecte de la PGRN sobre l'emmagatzematge lisosòmic en fibroblast d'11 pacients afectats per diferents LSD, la reducció més destacable de

l'acumulació lisosòmica es va detectar en els fibroblasts derivats dels pacients de la malaltia de Tay-Sachs. Els resultats van demostrar que els dominis G i E de la PGRN s'uneixen a l'enzim HEXA, que dona lloc a un augment de l'activitat enzimàtica, del lliurament lisosòmic i, finalment, una reducció del GM2 en els fibroblasts afectats per la malaltia de Tay-Sachs (Chen, 2018).

En general, les aproximacions terapèutiques basades en l'ús de xaperones farmacològiques només han demostrat certa eficàcia terapèutica a diversos estudis *in vitro* en cèl·lules de pacients de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. La PYR va ser la única xaperona farmacològica que es va testar en pacients afectats per la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, però només va demostrar una eficàcia terapèutica limitada.

2.8.5. Trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques

Com que l'enzim HEXA ($\alpha\beta$) és soluble i conté residus M6P, els pacients de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff es poden beneficiar del trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) de medul·la òssia, de cordó umbilical o de sang perifèrica, després d'un condicionament mieloablatiu (Hatzimichael, 2010). Gràcies al principi de la correcció creuada, les cèl·lules derivades de les cèl·lules mare del donant poden actuar com a font productora d'HEXA ($\alpha\beta$) i ser captada per les cèl·lules deficientes del pacient de la malaltia de Tay-Sachs o Sandhoff (Biffi, 2017). Aquesta estratègia s'ha realitzat amb èxit en altres LSD, com la MPS I (Hobbs, 1981; Visigalli, 2010), la MPS II (Gleitz, 2018) i la malaltia de Gaucher tipus 1 i 2 (Somaraju, 2017).

En el cas de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, també s'ha realitzat l'HSCT en un nombre limitat de pacients. El trasplantament al·logènic de medul·la òssia d'un nen asimptomàtic amb la malaltia de Tay-Sachs de fenotip subagut va resultar en un augment de l'activitat HEXA als leucòcits sense la prevenció dels efectes neurodegeneratius de la malaltia (Jacobs, 2005). Més endavant, un altre estudi clínic en cinc nens amb la malaltia de Tay-Sachs infantil sotmesos a un trasplantament de cordó, només dos pacients van aconseguir allargar la supervivència juntament amb una aturada del procés neurodegeneratiu, sense cap millora de les habilitats motrius (Prasad, 2008).

L'ús de vectors lentivirals que codificaven per les subunitats α i β per transduir les cèl·lules mare hematopoètiques (*hematopoietic stem cell*, HSC) aïllades de donants sans, així com cèl·lules mare neuronals i HSC de ratolí, va mostrar un augment en l'activitat β -hexosaminidasa total en fibroblasts humans i en les neurones i la glia dels

ratolins (Ornaghi, 2020). A més, les funcions fisiològiques d'aquestes cèl·lules mare, com ara la proliferació, l'autorenovació o la multipotència, es van mantenir sense canvis, suggerint que la teràpia gènica *ex vivo* podria ser una opció per al tractament de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff (Ornaghi, 2020).

Un repte comú en l'HSCT al·logènica és la malaltia de l'empelt contra l'hoste. De fet, un 10% dels pacients que pateixen malalties hereditàries metabòliques i han rebut un trasplantament de cordó umbilical de donant compatible no relacionat, desenvolupen la malaltia de l'empelt contra l'hoste de forma aguda (Prasad, 2008). Per superar aquesta limitació, les aproximacions terapèutiques recents utilitzen cèl·lules mare humanes hipoinmunogèniques, que eviten la malaltia d'empelt contra l'hoste mitjançant l'evasió de la resposta immune tant cel·lular com humoral (Deuse, 2019; Han, 2019). Tot i que han obert un nou horitzó per a l'HSCT, aquest enfocament terapèutic encara no s'ha aplicat ni a la malaltia de Tay-Sachs ni a la de Sandhoff.

A causa de les limitacions que presenten les aproximacions terapèutiques en desenvolupament, tant en fase pre-clínica com en fase clínica per al tractament de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, és necessari la recerca de noves estratègies terapèutiques que puguin aconseguir un tractament efectiu i segur a llarg termini. Així doncs, una dels camps més actius en la recerca de possibles alternatives terapèutiques per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff és la teràpia gènica. A més, recentment, diversos productes terapèutics de teràpia gènica *in vivo* ja han arribat a fase comercial a Europa, com Glybera, Luxturna i Zolgensma, pel tractament de la deficiència de la lipoproteïna lipasa, la distrofia retiniana hereditària i l'atròfia muscular espinal, respectivament (Carvalho, 2021).

3. TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica és una estratègia terapèutica molt prometedora que consisteix en la introducció de material genètic (DNA o RNA) exogen a l'interior de les cèl·lules diana per tal de prevenir, aturar o revertir la patologia d'una malaltia. Es poden utilitzar diferents estratègies per assolir aquests objectius: introduir nous gens o versions correctes de gens mutats, modular l'expressió dels gens cel·lulars (incrementant, disminuint o silenciament l'expressió) o corregint la seqüència nucleotídica dels gens mutats mitjançant l'edició gènica (Naldini, 2015).

Avui en dia, la teràpia gènica s'ha convertit en una eina molt prometedora per al tractament de moltes malalties, sobretot les monogèniques i, en particular, les LSD, ja que tenen determinades característiques que les fa idònies. En primer lloc, un augment del voltant del 10% de l'activitat enzimàtica en algunes LSD és suficient per prevenir l'acumulació primària (Parenti, 2015). En segon lloc, com que moltes proteïnes lisosòmiques són secretables, les cèl·lules corregides amb el transgèn són capaces de sintetitzar i secretar la proteïna funcional al medi extracel·lular per ser captada per les cèl·lules no corregides de l'organisme mitjançant el mecanisme de la correcció creuada (Haurigot, 2013b; Motas, 2016; Ribera, 2015; Roca, 2017; Ruzo, 2012).

Hi ha dos tipus de teràpia gènica segons la metodologia utilitzada, *ex vivo* i *in vivo*. La teràpia gènica *ex vivo* es basa en obtenir cèl·lules de pacients o donants, modificar-les genèticament *in vitro* i, finalment, trasplantar-les al pacient. Per altra banda, a la teràpia gènica *in vivo* s'administra el material genètic directament al pacient (Chira, 2015). Segons el vector utilitzat per l'administració del material genètic, la teràpia gènica també es pot classificar en: 1) viral, on els vectors provenen de virus modificats genèticament, o 2) no viral, basada en l'administració del DNA a l'interior de les cèl·lules mitjançant mètodes químics, com la utilització de liposomes o polímers catiónics. Normalment, la transferència del material genètic mitjançant la teràpia no viral aconsegueix una expressió transitòria que, a la vegada, és molt baixa (Chira, 2015).

D'entre els diferents tipus de vectors virals utilitzats en teràpia gènica *in vivo*, els vectors derivats dels virus adenoassociats (*adeno-associated virus*, AAV) són els més utilitzats, ja que tenen un excel·lent perfil de seguretat, una baixa immunogenicitat i permeten l'expressió del transgèn de forma estable al llarg del temps, ja que es queden de forma episomal al nucli cel·lular. A més, s'han utilitzat prèviament en molts protocols de teràpia gènica *in vivo* per altres malalties en clínica humana, per tant, actualment estan molt ben caracteritzats (Mingozzi, 2011; Piguet, 2017).

3.1. Vectors virals adenoassociats

Els vectors AAVs deriven dels virus humans de la família *Parvoviridae*, del gènere *Dependoviridae*. En general, els virus adenoassociats són molt poc immunogènics i no patogènics, ja que no provoquen cap malaltia humana coneguda, encara que la majoria dels humans (>70%) són seropositius per un o més serotips (Lentz, 2012). Els AAVs necessiten la coinfecció d'un altre virus *helper* (Adenovirus, Herpesvirus, citomegalovirus humà o virus del papil·loma) per tal de replicar-se i completar el seu cicle vital (Atchison, 1965; Balakrishnan, 2014; Hoggan, 1966). Els AAV són capaços d'infectar tant les cèl·lules en divisió com les quiescents on, en general, s'hi mantenen de forma episomal o, en freqüències molt baixes, es poden integrar dins una regió específica del cromosoma 19 humà (19q13.3-qter) (McCarty, 2004; Samulski, 2014).

3.1.1. Biologia dels virus adenoassociats

Els virus adenoassociats contenen un genoma de DNA de cadena simple (ssDNA) d'aproximadament 4.7 kb de longitud, que s'empaqueta dins la càpsida proteica icosaèdrica sense embolcall lipídic i amb un diàmetre d'uns 18-25 nm (Wang, 2019). La càpsida proteica del virus és molt estable, ja que és resistent a l'exposició breu a la calor, al pH àcid i a les proteases (Büning, 2003; Samulski, 2014).

El genoma viral està format per les repeticions terminals invertides (*Inverted Terminal Repeats*, ITR) que envolten 3 marcs oberts de lectura (*Open Reading Frame*, ORF). Aquests ORF codifiquen per les proteïnes funcionals del virus: 4 proteïnes reguladores (Rep), 3 proteïnes que conformen la càpsida (Cap) i la recentment descoberta proteïna activadora de l'assemblatge (APP) (Figura 10). Les ITRs són seqüències palindròmiques de 145 pb que flanquegen el genoma de l'AAV en els seus extrems 5' i 3', actuen com a origen de replicació i com a senyal d'empaquetament i d'integració (Kotterman, 2014). L'ORF *rep* codifica per quatre proteïnes Rep (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40) que se sintetitzen a partir dels mRNA iniciats pels promotors p5 i p19 per *splicing* alternatiu de l'ORF Rep (Figura 10) i són necessàries per a la replicació, la transcripció, la integració i l'encapsidació del genoma (Kotterman, 2014). Les dues proteïnes més grans, Rep78 i Rep68, són necessàries per a la replicació del genoma viral i tenen activitat endonucleasa, helicasa i ATPasa. Les dues proteïnes Rep més petites, Rep52 i Rep 40, només tenen activitat helicasa i són necessàries per l'encapsidació del genoma viral (Büning, 2003; Samulski, 2014). La síntesi de l'ORF *cap* es regula pel promotor p40, que per *splicing* alternatiu de l'ORF formarà les tres

proteïnes de la càpsida (VP1, VP2 i VP3). La proporció de les proteïnes VP1, VP2 i VP3 a la càpsida és d'aproximadament 1:1:10 (Wang, 2019). El mRNA que codifica per la VP2 i la VP3 conté un segon ORF que codifica per l'AAP (Figura 10), una proteïna que promou l'assemblatge, a més de facilitar l'entrada al nucli de la VP3 i la maduració de la càpsida proteica (Büning, 2003; Samulski, 2014).

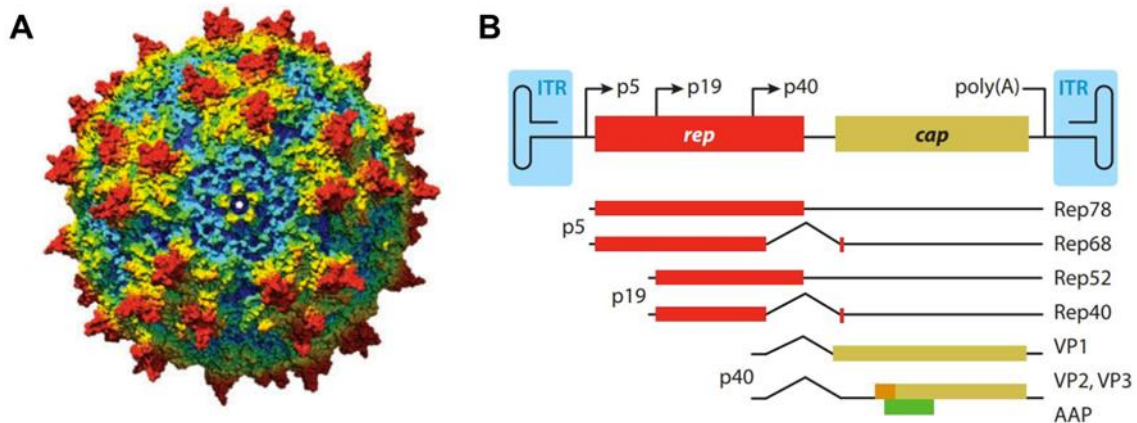


Figura 10. Representació esquemàtica de l'estructura de l'AAV2. (A) Imatge tridimensional de la càpsida d'un AAV generada per cristal·lografia a partir d'un AAV2. **(B)** Mapa genètic d'un virus adenoassociat, on es representen els gens *rep* (vermell), *cap* (groc) i AAP (verd), flanquejats per les ITR (blau). De color taronja, s'identifica la seqüència addicional que té la VP2 respecte la VP3. Adaptat de (Samulski, 2014).

L'AAV entra a l'interior de les cèl·lules interaccionant amb un receptor cel·lular i s'internalitza a través de les vesícules de clatrina fins que s'incorpora als endosomes primerencs. L'acidificació dels endosomes provoca un canvi conformacional de la proteïna VP1 (Wang, 2019), que permet que els AAVs surtin dels endosomes i puguin introduir el seu genoma al nucli cel·lular (Büning, 2003). La síntesi de la cadena complementària del DNA viral és un pas crític i limitant en la replicació del virus, es necessita tant la maquinària enzimàtica de la cèl·lula com les proteïnes virals *Rep*. Sense un virus auxiliar, el genoma viral pot persistir de forma episomal formant monòmers o bé concatàmers circulars (Nakai, 2003; Naso, 2017).

3.1.2. Producció dels vectors AAV recombinants

Els vectors AAV dissenyats per teràpia gènica estan basats principalment amb el AAV de serotip 2 (AAV2), ja que és el serotip més ben caracteritzat. Els vectors AAV es generen mitjançant la substitució dels ORFs del genoma viral pel casset d'expressió d'interès, però es mantenen les dues ITR necessàries per l'encapsidació (Büning, 2003). El casset d'expressió no pot superar el màxim de 4.7 kb per evitar possibles problemes d'encapsidació, i ha de contenir un promotor, un gen o regió codificant i una senyal de poliadenilació (poliA) (Samulski, 2014). D'aquesta manera, els vectors AAV perden la capacitat d'expressar les proteïnes virals, minimitzant l'acció dels sistema immunitari contra les cèl·lules transduïdes. Tot i això, s'han descrit algunes respostes immunes en humans desencadenades pel reconeixement de les proteïnes de la càpsida dels vectors AAV (Manno, 2006; Mingozzi, 2009).

Actualment, la tecnologia de producció dels vectors AAV ha avançat molt i l'ús del protocol de triple transfecció en cèl·lules embrionàries humanes de ronyó HEK 293 (*human embryonic kidney 293 cells*) s'ha estès àmpliament per tal d'evitar la contaminació del virus *helper*. El protocol de triple transfecció aporta les proteïnes necessàries de l'AAV i del virus *helper* mitjançant tres plasmidis (Wang, 2019). Un plasmidi conté el casset d'expressió d'interès flanquejat per les ITRs, que permetran la seva encapsidació. Un segon plasmidi codifica els ORF *Rep* i *Cap* necessaris per la producció dels vectors AAV (pRep/Cap), i no conté ITRs. Finalment, un tercer plasmidi aporta les funcions adenovirals necessàries per a la replicació dels AAVs (pAdHelper), també sense ITRs. Els tres plasmidis es co-transfecten en cèl·lules HEK293 per formar els vectors AAV que contenen el casset d'expressió flanquejat per les ITRs dins de les proteïnes de la càpsida (Figura 11). Les partícules virals es purifiquen del lisat cel·lular mitjançant la centrifugació en gradient de densitat (CsCl o iodixanol) i/o per cromatografia en columna. La preparació purificada del vector pot contenir càpsides buides, la quantitat de les quals és inversament proporcional a l'eficiència d'empaquetament del vector i al mètode de purificació. El mètode de purificació més eficient a nivell pre-clínic per reduir les càpsides buides i les impureses de DNA i proteïna és la precipitació amb polietilè glicol (PEG) i la purificació amb gradients de CsCl, maximitzant l'eficiència de transducció *in vivo* (Ayuso, 2010).

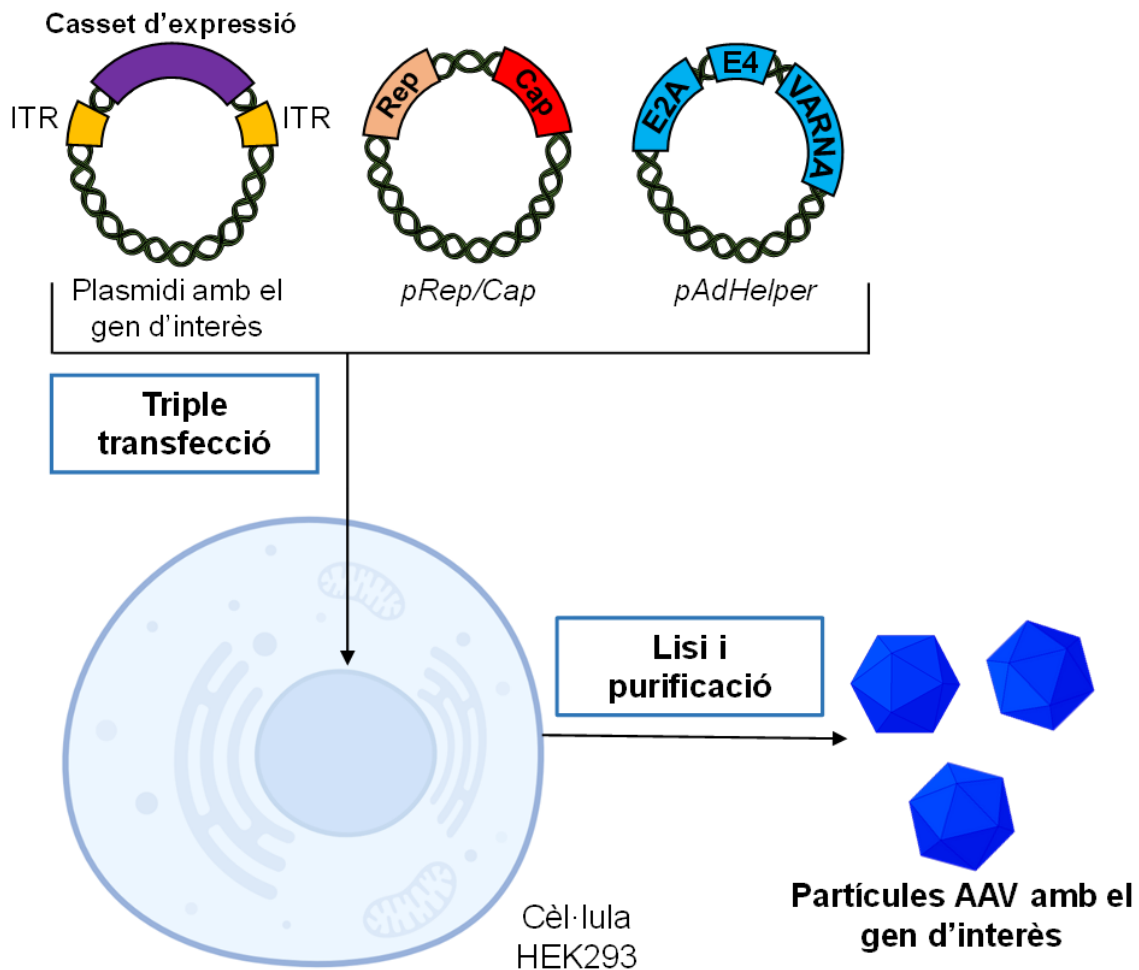


Figura 11. Producció dels vectors AAV mitjançant el sistema de triple transfecció en les cèl·lules HEK293. Per a la producció dels vectors AAV, es transfecten les cèl·lules HEK293 amb tres plasmidis: (i) un plasmidi conté el cassat d'expressió flanquejat per les ITRs, (ii) un altre plasmidi pRep/Cap aporta les proteïnes REP i CAP en *trans*, i (iii) el tercer plasmidi *AdHelper* aporta *en trans* les funcions pròpies d'un adenovirus *helper* necessàries per a la producció dels vectors AAV. Aquesta tècnica permet encapsidar només el material genètic localitzat entre les ITRs, evitant l'encapsidació dels gens virals aportats en *trans* en els plasmidis. Adaptat de(Büning, 2008).

Pel disseny de la majoria de constructes es fan servir les ITR de l'AAV2, un serotip molt ben caracteritzat. Ara bé, segons el tipus cel·lular que interressi modificar genèticament, es poden usar els gens Cap d'altres serotips d'AAV, ja que les proteïnes Cap determinen l'afinitat amb els receptors i co-receptors cel·lulars i, per tant, determinen el tropisme dels vectors virals (Grimm, 2008; Rabinowitz, 2002). La Taula 5 descriu els serotips d'AAV més utilitzats en teràpia gènica *in vivo*, els receptors i co-receptors que permeten l'entrada del vector a la cèl·lula i el seu tropisme. Gràcies al seu perfil de seguretat i la seva expressió robusta a llarg termini, les aproximacions de teràpia gènica basades en l'ús dels vectors AAV9 són les més utilitzades en diverses LSDs, com les MPSs (Haurigot, 2013b; Marcó, 2021; Motas, 2016; Ribera, 2015; Roca,

2017), la malaltia de Pompe (Hordeaux, 2017) i les gangliosidosis GM2 (Lahey, 2020; Tropak, 2016).

Taula 5. Origen, receptors, co-receptors i tropisme dels principals serotips dels vectors AAV.

Serotip	Origen	Receptor i co-receptors	Tropisme
AAV1	Humà o PNH	Àcid siàlic N-unit	Múscul esquelètic, SNC, retina, pàncrees, cor, fetge
AAV2	Humà	HS, FGFR1, HGFR, LamR, integrines $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_5\beta_1$	Cèl·lules musculars vasculares, múscul esquelètic, SNC, fetge, ronyó, retina
AAV3	Humà o PNH	HS, FGFR1, HGFR, LamR	Múscul esquelètic, hepatocarcinoma, oïda interna
AAV4	PNH	Àcid siàlic O-unit	SNC (ependimòcits), retina, pulmó, fetge
AAV5	Humà	Àcid siàlic N-unit, PDGFR	Múscul esquelètic, SNC (ependimòcits), pulmó, retina, fetge
AAV6	Humà	HS, Àcid siàlic N-unit, EGFR	Múscul esquelètic, cor, pulmó
AAV7	Macaco rhesus	Desconegut	Múscul esquelètic, SNC, retina, fetge
AAV8	Macaco rhesus	LamR	Fetge, SNC, retina, pàncrees, cor, múscul esquelètic, teixit adipós
AAV9	Humà	Galactosa N-unida, LamR	Fetge, SNC, retina, pàncrees, cor, múscul esquelètic, teixit adipós, ronyó, testicles, pulmó
AAVrh10	Macaco rhesus	LamR	Fetge, SNC, retina, pàncrees, cor, múscul esquelètic, ronyó, pulmó

PNH: Primats No Humans; HS: Heparan Sulfat; FGFR1: Receptor del Factor de Creixement dels Fibroblasts tipus 1 (*Fibroblast growth factor receptor type 1*); HGFR: Receptor del Factor de Creixement d'Hepatòcits (*Hepatocyte growth factor receptor*); LamR: Receptor de la Laminina (*Laminin receptor*); PDGFR: Receptor del Factor de Creixement derivat de les Plaquetes (*Platelet-derived growth factor receptor*); EGFR: Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic (*Epidermal growth factor receptor*), SNC: Sistema Nerviós Central. Adaptat de (Balakrishnan, 2014; Lentz, 2012; Lisowski, 2015).

3.2. Teràpia gènica per a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

Com que les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff són malalties monogèniques, la teràpia gènica *in vivo* basada en la transferència del gen funcional podria ser una bona estratègia terapèutica per al seu tractament. Tot i això, el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica no és tant obvi ni senzill, ja que molts estudis destaquen la importància de tenir les dues còpies dels gens *HEXA* i *HEXB* en una proporció equimolar per tal d'aconseguir la dimerització correcta de l'isoenzim HEXA ($\alpha\beta$) (Rastall, 2015; Woodley, 2018). En conseqüència, diferents grups de recerca han invertit esforços, durant els darrers anys, per desenvolupar estratègies terapèutiques basades en la teràpia gènica per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff.

S'han descrit una àmplia varietat d'estudis de teràpia gènica en models animals petits i grans de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, usant principalment vectors AAV (Picache, 2022), però també vectors retrovirals (Guidotti, 1998), vectors lentivirals (Beegle, 2020; Ornaghi, 2020; Shaimardanova, 2022; Tsuji, 2005), vectors adenovirals (Bourgoin, 2003; Guidotti, 1999) i vectors derivats del virus de l'herpes simple (Martino, 2005). D'entre tots els estudis realitzats, alguns d'ells es basen en l'ús de vectors monocistrònics, només codifiquen per un únic gen, l'*HEXA* o l'*HEXB*, o bé bicistrònics, on el mateix vector codifica per ambdós gens simultàniament, tant *HEXA* com *HEXB*.

3.2.1. Teràpia gènica basada en l'administració d'un sol vector monocistrònic

A l'inici del desenvolupament de les estratègies de teràpia gènica, els investigadors van basar-se en l'ús dels vectors monocistrònics administrats directament al parènquima cerebral o bé per via intravenosa, ja sigui codificant una o altra subunitat de l'isoenzim HEXA ($\alpha\beta$). Alguns estudis només van utilitzar el vector que contenia el gen afectat per la malaltia, és a dir, en el tractament dels models animals de la malaltia de Sandhoff, el gen *HexB*, i en el cas de la malaltia de Tay-Sachs, el gen *HexA*.

La primera aproximació es va centrar en l'administració intraparènquima d'un vector adenoviral que contenia el gen *HexB* a ratolins Sandhoff d'un mes d'edat. Després del tractament, es va detectar una bona distribució del vector a dosis baixes, però dosis molt altes del vector adenoviral van provocar lesions importants a l'encèfal (Bourgoin, 2003). Aquesta aproximació terapèutica basada en l'administració intraparènquima també es va provar en els ratolins Tay-Sachs de 5 mesos d'edat, però utilitzant un vector de l'herpes simple que codificava pel gen *HexA*. Els resultats van demostrar un augment de l'activitat β -hexosaminidasa a l'encèfal i a la medul·la espinal

que resultava en una normalització del contingut del gangliòsid GM2 (Martino, 2005). També es va analitzar l'eficàcia terapèutica després de l'administració intravenosa del vector viral AAV9 que codificava pel gen *HexB* a ratolins Sandhoff d'1-2 dies d'edat. En aquest estudi, es va observar únicament una prevenció del desenvolupament de la malaltia, ja que es van administrar els animals abans del desenvolupament dels símptomes (Niemir, 2018; Walia, 2015).

3.2.2. Teràpia gènica basada en la co-administració de dos vectors monocistrònics

Després de detectar certa eficàcia terapèutica administrant únicament el gen afectat per la malaltia, van sorgir noves estratègies que utilitzen la co-administració de dos vectors monocistrònics que codifiquen per la subunitat α i β per separat. La co-administració dels vectors AAV1 o AAV2 directament al parènquima cerebral dels ratolins Sandhoff resulta en una bona distribució de l'enzim a tot l'encèfal, que condueix a una reducció de l'acumulació del gangliòsid GM2 i la neuroinflamació, una millora de les funcions motores i un augment de la supervivència. Aquests resultats únicament es van observar quan els dos vectors s'administraven amb múltiples administracions i no especifiquen la dosi administrada (Cachón-González, 2012, 2006, 2014).

Una altra aproximació terapèutica basada en la co-administració de dos vectors AAVrh8, codificants pels dos gens per separat, es va administrar a diferents zones del parènquima cerebral en el model felí de Sandhoff. Aquests estudis han detectat un augment significatiu de l'activitat β -hexoaminidasa, una millora en l'acumulació dels gangliòsids i un augment de la supervivència de 10 mesos únicament en els gats administrats abans de desenvolupar indicis de la malaltia (Bradbury, 2013, 2015, 2017; McCurdy, 2015, 2021; Rockwell, 2015).

Aquesta aproximació de teràpia gènica també s'ha testat en el model oví de la malaltia de Tay-Sachs, on els animals van rebre dues injeccions bilaterals al tàlem i una al ventricle lateral esquerre entre els 2 i els 4 mesos d'edat, on l'animal encara no presenta símptomes de la malaltia. Es van aconseguir uns nivells normals o, fins i tot suprafisiològics d'activitat HEXA ($\alpha\beta$) en les ovelles tractades, que va resultar en un retard en l'aparició dels símptomes o una prevenció d'alguns d'ells, com per exemple, l'acumulació de gangliòsids a la majoria de les zones de l'encèfal, excepte al cerebel i a la medul·la espinal, i la neuroinflamació (Gray-Edwards, 2018).

Aquests resultats en el model felí de Sandhoff i l'oví de Tay-Sachs van permetre traslladar a la clínica aquesta aproximació de teràpia gènica basada en la co-

administració de dos vectors monocistrònics AAVrh8 codificants per la subunitat α o β . Prèviament, es va realitzar un estudi toxicològic en *Cynomolgus macaques*, on la co-administració dels vectors AAVrh8 via intracranial (dues injeccions bilaterals al tàlem i una al ventricle lateral esquerra) a diferents dosis, on la majoria dels animals van desenvolupar discinèsies, atàxia, pèrdua de destresa i necrosi de la substància blanca i grisa al voltant dels punts d'injecció (Golebiowski, 2017). Tot i aquests resultats negatius en els estudis de toxicitat, s'ha iniciat un assaig clínic amb pacients de Tay-Sachs i Sandhoff amb la forma infantil i juvenil. Als pacients s'ha administrat una concentració equimolar dels vectors AAVrh8 que codifiquen per les dues subunitats de l'enzim HEXA ($\alpha\beta$) directament al LCR i al tàlem (NCT04669535). Les dades preliminars de l'assaig clínic amb humans han demostrat un bon perfil de seguretat de l'aproximació terapèutica després del tractament de dos pacients prèviament immunosuprimits; tot i això, aquests pacients tractats només han mostrat un augment modest de l'activitat HEXA en el LCR (Flotte, 2022).

3.2.3. Teràpia gènica basada en l'administració de vectors monocistrònics codificants pels dos gens

Per tal de millorar les estratègies de teràpia gènica, es van començar a plantejar noves estratègies terapèutiques que permetessin expressar els dos gens, *HexA* i *HexB*, en un únic vector viral. El fet de tenir ambdós gens al mateix vector permetria assegurar l'expressió d'ambdues subunitats a la mateixa cèl·lula en una proporció equimolar per tal d'aconseguir una eficient dimerització de la proteïna HEXA ($\alpha\beta$) (Woodley, 2018). A més, també comporta la reducció de la dosi injectada i, en conseqüència, el risc de les respostes immunes contra la càpsida i els esdeveniments d'oncogènesis per inserció del vector viral, que augmenten amb l'increment de la dosi (Rastall, 2015; Woodley, 2018). L'ús d'un sol vector també permet disminuir a la meitat els costos de producció dels vectors AAV (Woodley, 2018).

Es va desenvolupar una nova estratègia terapèutica basada en la creació d'un gen híbrid de la β -hexosaminidasa, l'*HexM*. Aquesta nova proteïna quimèrica fusiona el lloc actiu de la subunitat α i la interfície estable de la subunitat β , juntament amb d'altres àrees de cada subunitat necessàries per a la interacció amb el GM2A i el gangliòsid GM2, donant lloc a una proteïna diferent de l'endògena HEXA ($\alpha\beta$), però amb la seva funcionalitat (Karumuthil-Meilethil, 2016). Estudis en el model murí de la malaltia de Sandhoff després de l'administració intravenosa d'aquest gen a neonats amb vectors AAV8 i AAV9, van demostrar la capacitat de l'HEXM per incrementar l'activitat β -hexosaminidasa que podia prevenir parcialment l'acumulació del gangliòsid GM2 i

augmentar uns 6 mesos la supervivència (Osmon, 2016; Ou, 2020; Tropak, 2016). No obstant, podia reduir l'acumulació de GM2 només de forma local quan s'injectava intracranialment a ratolins adults (Tropak, 2016). També es va administrar intraparenquima a animals Tay-Sachs de 15 mesos d'edat amb un AAV9 que codificava per *HexM*, es va observar que només podia reduir l'acumulació de GM2 de forma local (Karumuthil-Melethil, 2016). Posteriorment un estudi va revelar una resposta immune contra HEXM i la càpsida després de l'administració intravenosa d'HEXM, també degut a que una administració intravenosa a altes dosis augmenta molt la possibilitat de iniciar una resposta immunitària (Kot, 2021).

3.2.4. Teràpia gènica basada en l'administració de vectors bicistrònics per a les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff

Una altre estratègia per co-administrar les dues subunitats (α i β) en el mateix vector viral és la utilització de vectors bicistrònics. Una de les opcions àmpliament utilitzades en el camp de la teràpia gènica és la seqüència del lloc intern d'entrada al ribosoma (*internal ribosome entry site*, IRES), un element per generar vectors bicistrònics que permet co-expressar diferents gens sota el control del mateix promotor (Shaimardanova, 2019). Dos estudis *in vitro* en fibroblast de pacients Sandhoff, on utilitzen vectors lentivirals que codifiquen pels gens de les dues subunitats α i β d'HEXA unides per l'IRES, van detectar un augment de l'activitat β -hexosaminidasa i una reducció de l'acumulació del gangliòsid GM2 (Arfi, 2005; Batista, 2010).

Una altra estratègia descrita és la utilització d'un promotor bidireccional per impulsar l'expressió de les dues subunitats (α i β) en direccions oposades en el mateix vector. Així, el vector AAV9-*HexA-HexB* i el vector PHP.B-*HexA-HexB* administrats per via intravenosa a una dosi alta de 1×10^{12} vg/animal a ratolins Sandhoff d'un mes d'edat va permetre un augment en l'activitat enzimàtica al fetge i al SNC, una millora en les proves motores, així com també una reducció del gangliòsid GM2 al SNC i un augment de la supervivència (Lahey et al., 2020).

A més, els constructes terapèutics bicistrònics també han usat l'element P2A, un pèptid que anteriorment es pensava que era d'autoescissió, però recentment s'ha demostrat que pot induir el salt del ribosoma durant la traducció d'una proteïna per tal d'expressar tant *HexA* com *HexB* (Liu, 2017). D'aquesta manera, es poden obtenir la subunitat α i la β de forma separada dins les cèl·lules. Després de la transducció de cèl·lules HEK293 i cèl·lules derivades de ratolins i pacients Sandhoff amb els vectors bicistrònics lentivirals que codificaven pels gens *HexA* i *HexB* units amb el P2A, es va

observar un augment de l'activitat β -hexosaminidasa (Ornaghi, 2020; Shaimardanova, 2022). Els estudis *in vivo* en rates control/ sanes (*wild-type*, WT) basats en la mateixa aproximació de teràpia gènica va donar lloc a uns resultats molt similars (Shaimardanova, 2022). Un altre estudi va utilitzar els vectors AAV9 codificants pels gens *HexA* i *HexB* units pel P2A per administrar-los per via intravenosa a una dosi de 2.04×10^{13} vg/kg a ratolins Sandhoff d'un dia d'edat. Després del tractament, es va observar un increment de l'activitat β -hexosaminidasa i una prevenció de l'acumulació de GM2 a l'encèfal, tot i que l'esperança de vida només es va allargar fins al voltant dels 6 mesos d'edat (Woodley, 2018). Recentment, s'ha aprovat un assaig clínic en fase 1 per al tractament dels pacients de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff d'inici infantil basant-se en l'ús d'un vector AAV9 bicistrònic que codifica per ambdós gens simultàniament en un sol constructe (NCT04798235), però actualment està suspès.

Tot i la gran quantitat i diversitat d'estudis centrats en el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, molts estudis només han aconseguit una correcció parcial de la malaltia; d'altres, han demostrat una prevenció de la malaltia gràcies al tractament dels animals de forma presimptomàtica; o bé n'hi ha d'altres que la correcció és més bona després d'utilitzar dosis molt altes que comporten el risc de desenvolupar una resposta immune i toxicitat hepàtica associada al tractament. Aquests fets evidencien la necessitat de trobar nous tractaments de teràpia gènica més optimitzats i eficaços per tal d'aconseguir una reversió completa de les severes alteracions provocades per les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff i, d'aquesta manera, poder traslladar aquesta aproximació terapèutica a la clínica humana amb èxit.

III. OBJECTIUS

Les malalties de Sandhoff i Tay-Sachs són malalties autosòmiques recessives caracteritzades principalment per una disfunció del sistema nerviós central. Hi ha un ampli espectre de signes i símptomes clínics en els pacients d'aquestes malalties, sent les formes infantils les més habituals. Generalment presenten alteracions en el desenvolupament, neuroinflamació, convulsions, problemes motors, rigidesa i un ràpid deteriorament que acaba amb la mort prematura entre la primera i la tercera dècada de vida. Actualment no hi ha cap teràpia aprovada per aquestes malalties, els únics tractaments disponibles són els simptomàtics. Es per això, que és necessari desenvolupar estratègies terapèutiques noves per aconseguir la reversió de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors virals adenoassociats es presenta com una de les alternatives terapèutiques més prometedores ja que permet una expressió eficient a llarg termini i té un perfil molt bon perfil de seguretat.

L'objectiu principal d'aquesta tesi va ser **desenvolupar una aproximació de teràpia gènica per al tractament de les malalties de Sandhoff i Tay-Sachs basada en l'administració d'un vector dual que permeti expressar alhora *HEXA* i *HEXB* units per un *linker***. Aquest objectiu principal es va subdividir en dos objectius específics:

- 1. Caracteritzar les alteracions fisiopatològiques del model murí de Sandhoff en edats temperanes.**
- 2. Dissenyar una nova estratègia de teràpia gènica basada en vectors AAV9 duals que permetin expressar alhora els gens *HEXA* i *HEXB* units per un *linker*.**
- 3. Avaluar l'eficàcia terapèutica de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de Sandhoff.**
- 4. Avaluar l'efecte de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de Tay-Sachs.**

IV. RESULTATS

***Part 1. Caracterització dels models murins de les
malalties de Tay-Sachs i Sandhoff***

La primera part d'aquesta tesi doctoral es va centrar en la caracterització dels models de ratolí de la malaltia de Tay-Sachs i de Sandhoff. Ambdós models es van generar mitjançant la inserció d'un casset d'expressió del gen de resistència a la neomicina per tal de truncar l'expressió del gen d'interès (Sango, 1995). En el cas del ratolí model de la malaltia de Tay-Sachs, el casset d'expressió es va introduir a l'exó 8 del gen *HexA* i, al model de murí de la malaltia de Sandhoff, a l'exó 13 del gen *HexB* (Yamanaka, 1994).

1. CARACTERITZACIÓ DEL RATOLÍ MODEL DE LA MALALTIA DE TAY-SACHS

Com que el ratolí model de la malaltia de Tay-Sachs no presenta la simptomatologia característica de la malalta humana, a causa de la via alternativa de degradació del gangliòsid GM2 (Bertoni, 1999), només es va analitzar l'expressió dels gens *HexA* i *HexB* i les activitats HEXA i β -HEXO, juntament amb un estudi de la supervivència dels animals per comprovar que el fenotip descrit a la bibliografia es reproduïa també en el nostre laboratori.

1.1. Expressió dels mRNA i anàlisis de les activitats enzimàtiques

Per tal de comprovar que el model murí de la malaltia de Tay-Sachs era un ratolí *knock out* (KO) pel gen *HexA* (subunitat α), es va avaluar l'expressió d'aquest gen mitjançant una anàlisi per PCR quantitativa (qPCR) al fetge dels animals WT i a ratolins heterozigots i homozigots per la mutació del gen *HexA*. A més, també es van analitzar els nivells de mRNA del gen *HexB* (subunitat β). En ambdós sexes, els ratolins heterozigots presentaven una reducció dels nivells d'expressió del gen *HexA* d'aproximadament el 50%, comparat amb els nivells de mRNA dels animals WT (Figura 12A). En el cas dels ratolins Tay-Sachs, KO total (homozigot) del gen *HexA*, es va observar una reducció dels nivells d'expressió propera al 90%, tant en mascles com en femelles (Figura 12A). Com que el KO es va generar per la inserció del casset d'expressió del gen de resistència de la neomicina a l'exó 8, el 10% del transcrit detectat podria ser un mRNA truncat que es genera com a conseqüència de la transcripció del gen *HexA* fins al punt de la inserció. Tot i això, aquest transcrit generat seria inestable i produiria una proteïna no funcional, tal com es va comprovar amb l'anàlisi de l'activitat enzimàtica d'HEXA a l'encèfal i al fetge (Figura 13). L'activitat HEXA mesura principalment l'activitat enzimàtica de la isoforma HEXA ($\alpha\beta$), l'única capaç de degradar GM2, però també l'HEXS ($\alpha\alpha$). Pel que fa als nivells d'expressió del gen *HexB*, no es va observar cap diferència entre els ratolins WT, heterozigots i Tay-Sachs d'ambdós sexes (Figura 12B).

En quan a l'activitat β -hexosaminidasa total (β -HEXO), que mesura l'activitat de les tres isoformes (HEXA, HEXB i HEXS), només va detectar una disminució d'entre el 30-70% en els ratolins Tay-Sachs (Figura 13), ja que els nivells d'expressió del gen *HexB* (β) es mantenen constants en els tres grups experimentals (Figura 12B) i, per tant, hi havia activitat de la isoforma HEXB ($\beta\beta$) (Figura 13).

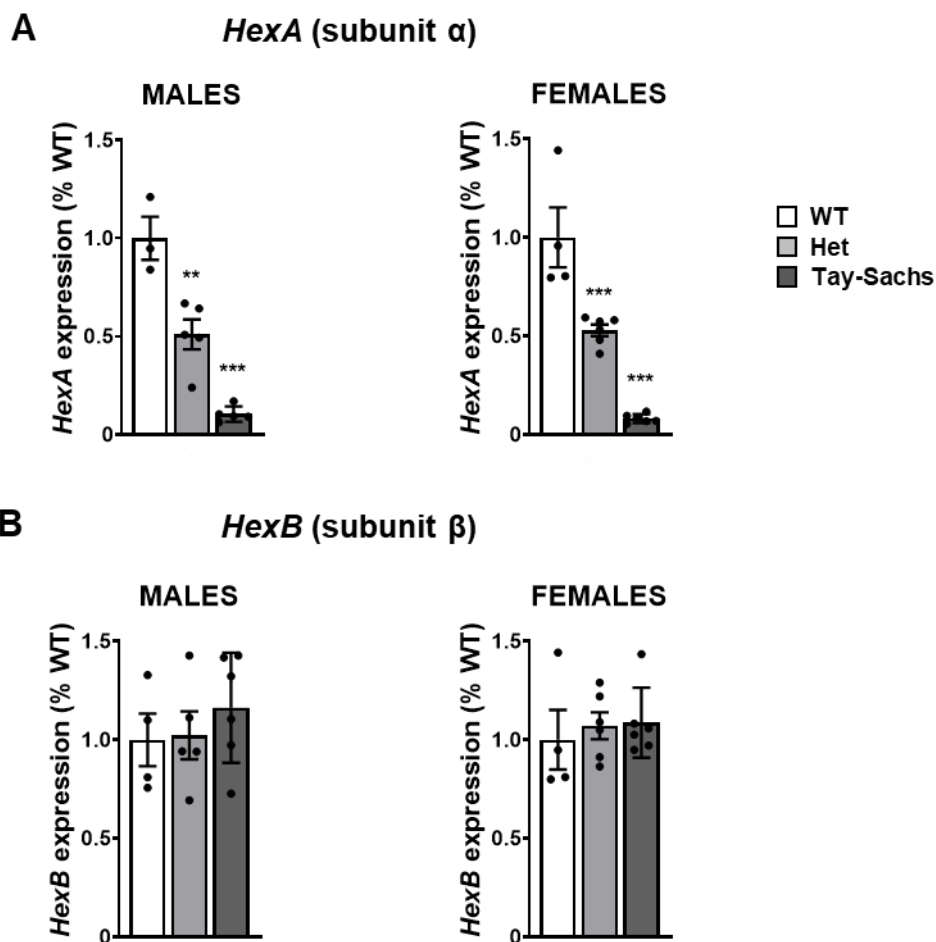


Figura 12. Expressió dels gens *HexA* i *HexB* al model murí de la malaltia de Tay-Sachs. (A, B) Estudi de l'expressió dels gens *HexA* (A) i *HexB* (B) per qPCR a les mostres de fetge dels ratolins WT, heterozigots (Het) i Tay-Sachs mascles i femelles als 8 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 3-6 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. WT.

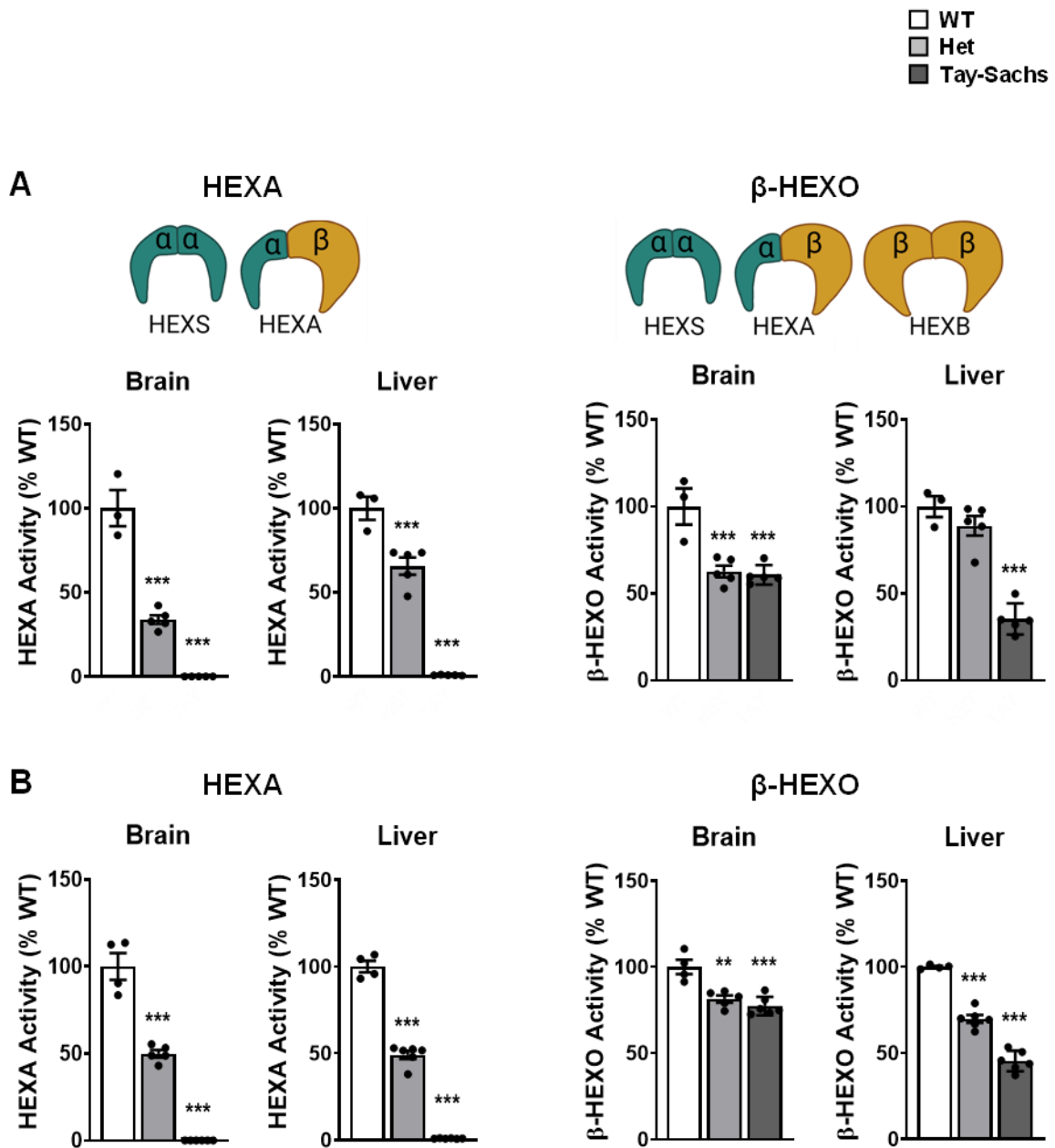


Figura 13. Activitat β-HEXO i HEXA al model murí de la malaltia de Tay-Sachs. (A, B) Determinació de l'activitat β-HEXO i HEXA als extractes proteics del cervell i el fetge dels ratolins WT, heterozigots (Het) i Tay-Sachs mascles (A) i femelles (B) als 8 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana ± SEM de 3-6 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. WT.

1.2. Supervivència

Tal com ja s'havia descrit prèviament, el model murí de la malaltia de Tay-Sachs és asimptomàtic (Phaneuf, 1996). Tot i això, es va finalitzar la caracterització del model murí de la malaltia de Tay-Sachs en el nostre laboratori amb un estudi de la supervivència. Tot i la reducció dràstica de l'expressió gènica d'*HexA* i una activitat HEXA inexistent en els ratolins Tay-Sachs, aquests presentaven una corba de supervivència pràcticament indistingible dels animals WT i heterozigots (Figura 14). En mascles, la vida mitjana dels ratolins WT, heterozigots i Tay-Sachs era de 26,1, 28,1 i 28,3 mesos d'edat, respectivament (Figura 14A); mentre que en femelles era de 26,8, 28,3 i 27,1 mesos d'edat en ratolins WT, heterozigots i Tay-Sachs (Figura 14B).

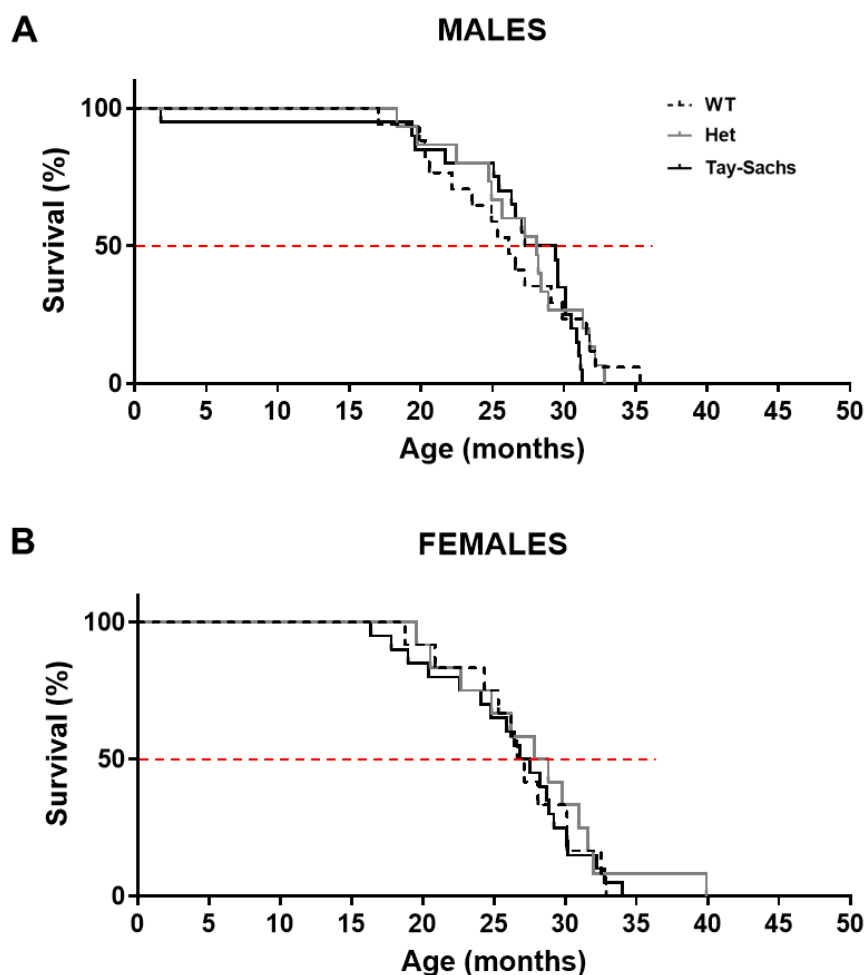


Figura 14. Estudi de la supervivència del model murí de la malaltia de Tay-Sachs. (A, B) Representació de les corbes de supervivència mitjançant l'estimador de Kaplan-Meier dels ratolins mascles WT (n=17), heterozigots (Het) (n=15) i Tay-Sachs (n=20) (A) i femelles WT (n=12), heterozigots (Het) (n=12) i Tay-Sachs (n=20) (B).

2. CARACTERITZACIÓ DEL RATOLÍ MODEL DE LA MALALTIA DE SANDHOFF

El model animal de la malaltia de Sandhoff presenta una simptomatologia característica molt similar a la que presenten els pacients de la malaltia humana (Sango, 1995). En el nostre estudi, es va fer una caracterització d'aquest model determinant la manca d'expressió del gen *HexB* (β) i comprovant l'expressió també del gen *HexA* (α) i les principals alteracions com a conseqüència de la manca d'activitat HEXA ($\alpha\beta$). Especialment, es necessitava mesurar la vida mitja d'aquests animals a les nostres instal·lacions i una edat on la malaltia ja estigues establerta, per tal de poder determinar l'edat adequada per iniciar el tractament de teràpia gènica.

2.1. Estudi de la deficiència del gen *HexB* i els seus efectes en la supervivència

2.1.1. Expressió dels mRNA i anàlisis de les activitats enzimàtiques

En primer lloc, es va comprovar que el model murí de la malaltia de Sandhoff era un ratolí KO però, en aquest cas, pel gen *HexB* (subunitat β). Per tant, es va analitzar l'expressió gènica d'*HexB* mitjançant un anàlisi per qPCR al fetge dels animals WT, heterozigots i Sandhoff als 2 mesos d'edat. A més a més, també es va estudiar el nivells de mRNA del gen *HexA* (α). En els ratolins heterozigots per la mutació del gen *HexB*, es va detectar una disminució d'aproximadament el 50% de l'expressió gènica d'*HexB*, en comparació amb els valors dels animals WT (Figura 15B). En canvi, els ratolins Sandhoff presentaven una reducció propera al 60% en mascles i d'un 80% en femelles (Figura 15B). Tal com havíem detectat prèviament al model murí de la malaltia de Tay-Sachs (Figura 12), la reducció de l'expressió gènica del gen mutat no era del 100%, molt probablement degut a la producció i detecció d'un transcrit més curt, fins al punt d'inserció del casset d'expressió del gen de la neomicina a l'exó 13 del gen *HexB*. Ara bé, aquest transcrit truncat possiblement era més inestable, i no era capaç de generar un enzim funcional (Figura 16).

En el cas del gen *HexA*, es va observar que hi havia una sobreexpressió gènica en els ratolins Sandhoff (Figura 15A), que podria ser causada per un intent de compensació del propi mecanisme cel·lular per la manca del gen *HexB*. Per altra banda, els ratolins heterozigots per la mutació del gen *HexB* presentaven uns nivells de mRNA del gen *HexA* similar als valors d'un animal WT (Figura 15A).

Pel que fa a les activitats, els ratolins Sandhoff presentaven una reducció de les activitats β -HEXO i HEXA pràcticament del 100% al cervell i al fetge, en ambdós sexes, mentre que els animals heterozigots per la mutació del gen *HexB* es va observar una

disminució d'entre un 50 i un 75% de l'activitat detectada als animals WT (Figura 16). Per tant, la presència d'un transcrit no funcional de la subunitat β condueix a l'absència de l'activitat de l'isoenzim HEXA (heterodímer format per una subunitat α i una β) i HEXB (homodímer format per dues subunitats β). En canvi, l'activitat HEXS (homodímer format per dues subunitats α) pràcticament era indetectable a causa de la inestabilitat de l'isoenzim i, conseqüentment, contribuïa molt poc tant als nivells de l'activitat β -HEXO com als de l'activitat HEXA (Lawson, 2016).

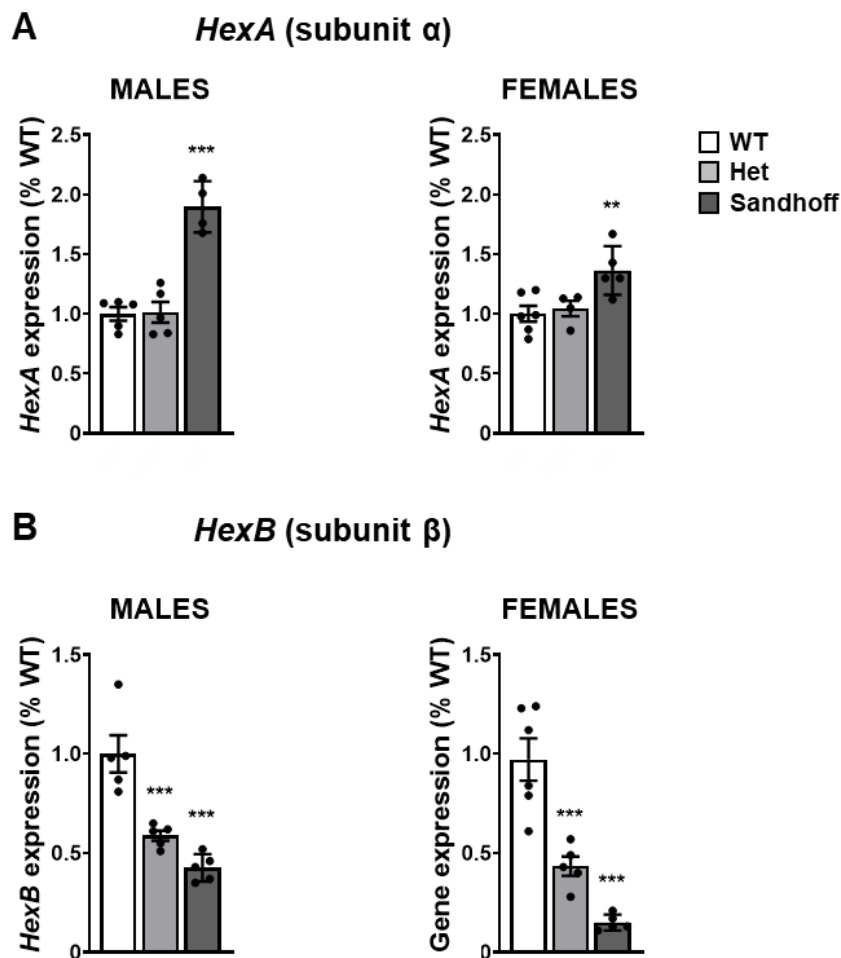


Figura 15. Expressió dels gens *HexA* i *HexB* al model murí de la malaltia de Sandhoff. (A, B) Estudi de l'expressió dels gens *HexA* (A) i *HexB* (B) per qPCR a les mostres del fetge dels ratolins WT, heterozigots (Het) i Sandhoff mascles i femelles als 2 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-6 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. WT.

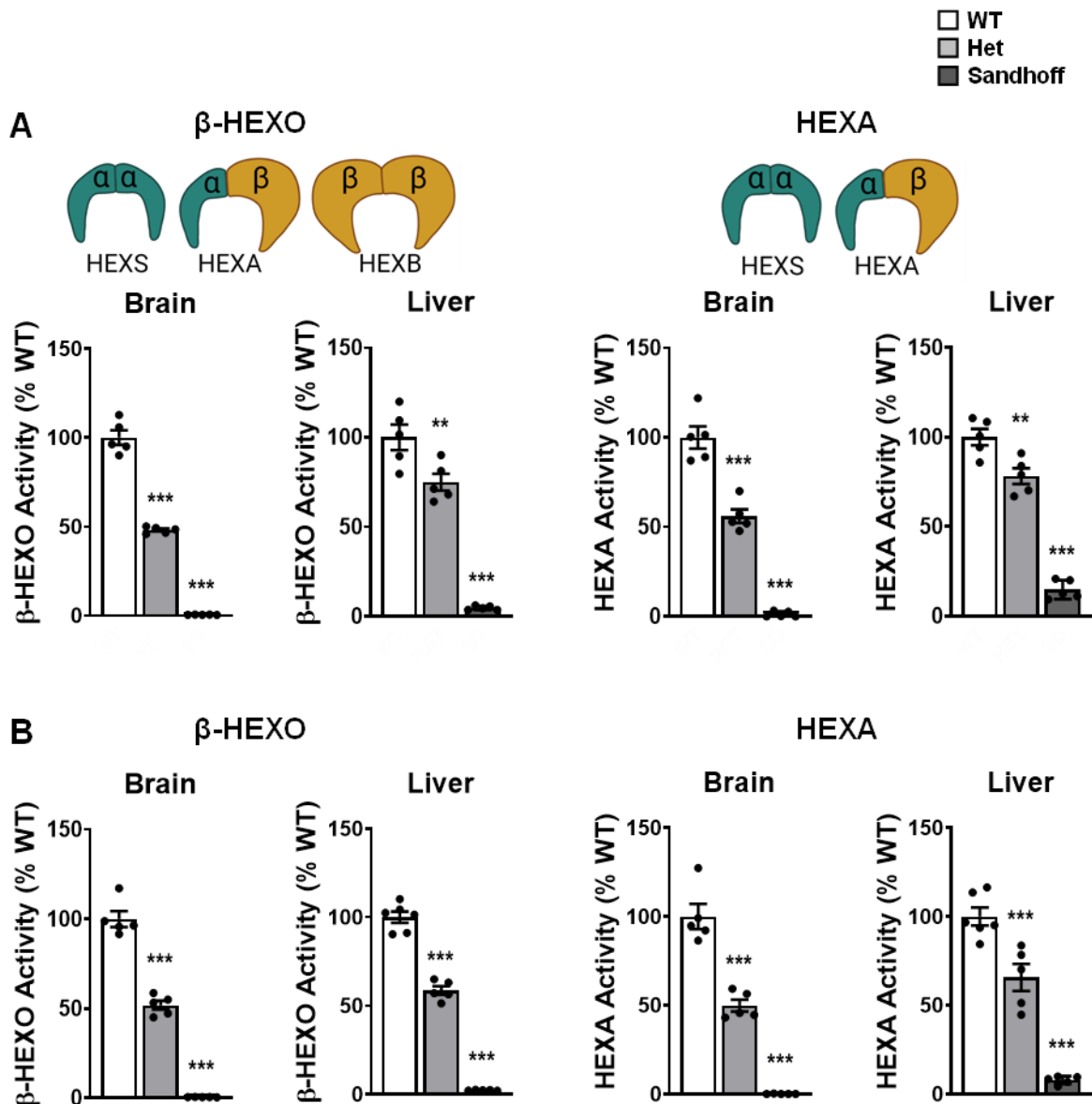


Figura 16. Activitat β-HEXO i HEXA al model murí de la malaltia de Sandhoff. (A, B) Determinació de l'activitat β-HEXO i HEXA als extractes proteics del cervell i el fetge dels ratolins WT, heterozigots (Het) i Sandhoff mascles **(A)** i femelles **(B)** als 2 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana ± SEM de 4-6 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. WT.

2.1.2. Supervivència

També es va realitzar un estudi de la supervivència per tal de comprovar l'efecte de la mutació del gen *HexB* en la longevitat. En aquest model de la malaltia de Sandhoff, es va observar una reducció dràstica de la supervivència en ambdós sexes (Figura 17). En mascles, es va passar d'una mediana de supervivència normal en ratolins de 31,3 i 29,4 mesos als animals WT i heterozigots, respectivament, a una mediana de 4,3 mesos als ratolins Sandhoff (Figura 17A). De manera similar, les femelles van mostrar una

mediana de supervivència de 29,4 i 28,1 mesos als animals WT i heterozigots, mentre que en els ratolins Sandhoff era de 4,2 mesos (Figura 17). Aquests resultats van confirmar que la mutació del gen *HexB* va provocar una disminució dràstica de l'esperança de vida al model murí de la malaltia de Sandhoff.

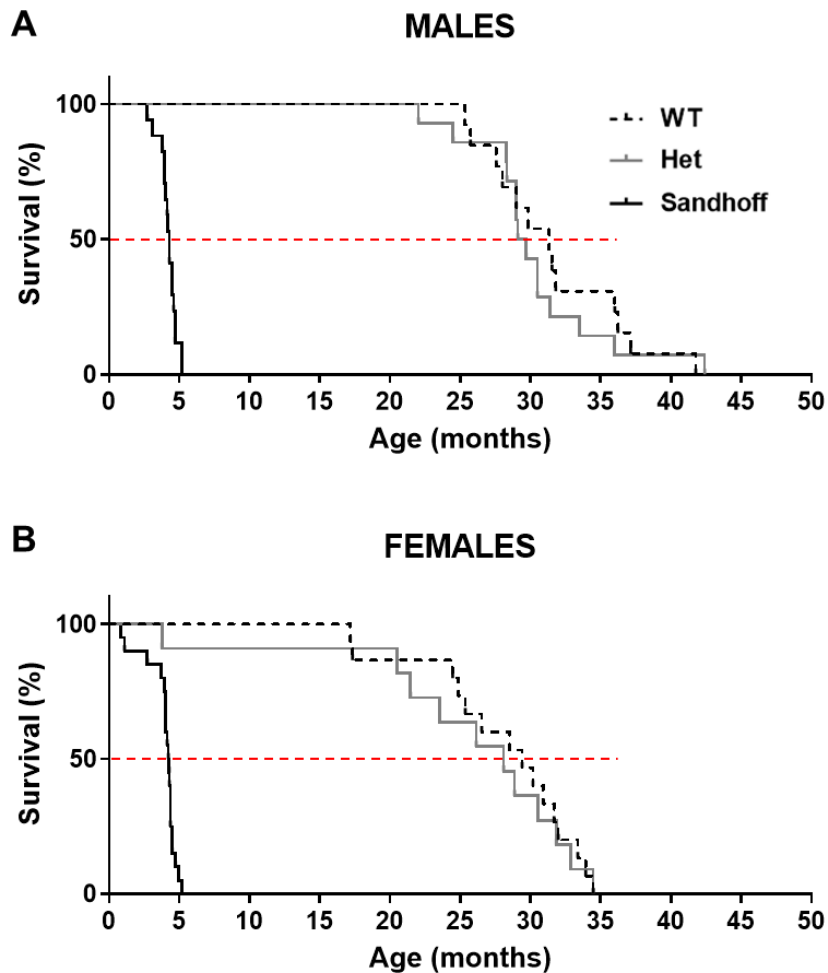


Figura 17. Estudi de la supervivència al model murí de la malaltia de Sandhoff. (A, B) Representació de les corbes de supervivència mitjançant l'estimador de Kaplan-Meier dels ratolins mascles WT (n=13), heterozigots (Het) (n=14) i Sandhoff (n=17) **(A)** i femelles WT (n=15), heterozigots (Het) (n=11) i Sandhoff (n=20) **(B)**.

2.2. Estudi de la patologia al SNC dels ratolins Sandhoff a una edat primerenca

El model murí de Sandhoff presenta una progressió molt ràpida de la malaltia, amb una vida mediana de 4,3 mesos d'edat. Per tant, es va analitzar si a un mes d'edat aquests ratolins Sandhoff ja tenien establertes les alteracions patològiques característiques al SNC, per tal de posteriorment dissenyar una nova aproximació de teràpia gènica, que ens permetés revertir la malaltia. Concretament, es va estudiar l'acumulació primària del gangliòsid GM2 i la secundària de colesterol, i també la distensió i l'homeòstasi lisosòmica i la neuroinflamació (astrocitosi).

2.2.1. Acumulació primària del gangliòsid GM2 a l'encèfal

En els pacients de gangliosidosis GM2, la deficiència de l'isoenzim HEXA provoca, principalment, l'acumulació patològica del gangliòsid GM2 a l'interior dels lisosomes (Leal et al., 2020). Per aquest motiu, es va avaluar l'acumulació del gangliòsid GM2 al model murí de la malaltia de Sandhoff a un més d'edat, tant en mascles com en femelles, mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica específica en talls histològics de l'encèfal. Els ratolins WT no presentaven cap senyal positiva de GM2; en canvi, els animals Sandhoff a un mes d'edat ja van mostrar una evident acumulació del gangliòsid GM2 a totes les regions analitzades, en ambdós sexes (Figura 18).

Així doncs, aquests resultats van evidenciar que el model murí de la malaltia de Sandhoff a un mes d'edat ja presentava una acumulació primària del gangliòsid GM2 de manera generalitzada a tot l'encèfal.

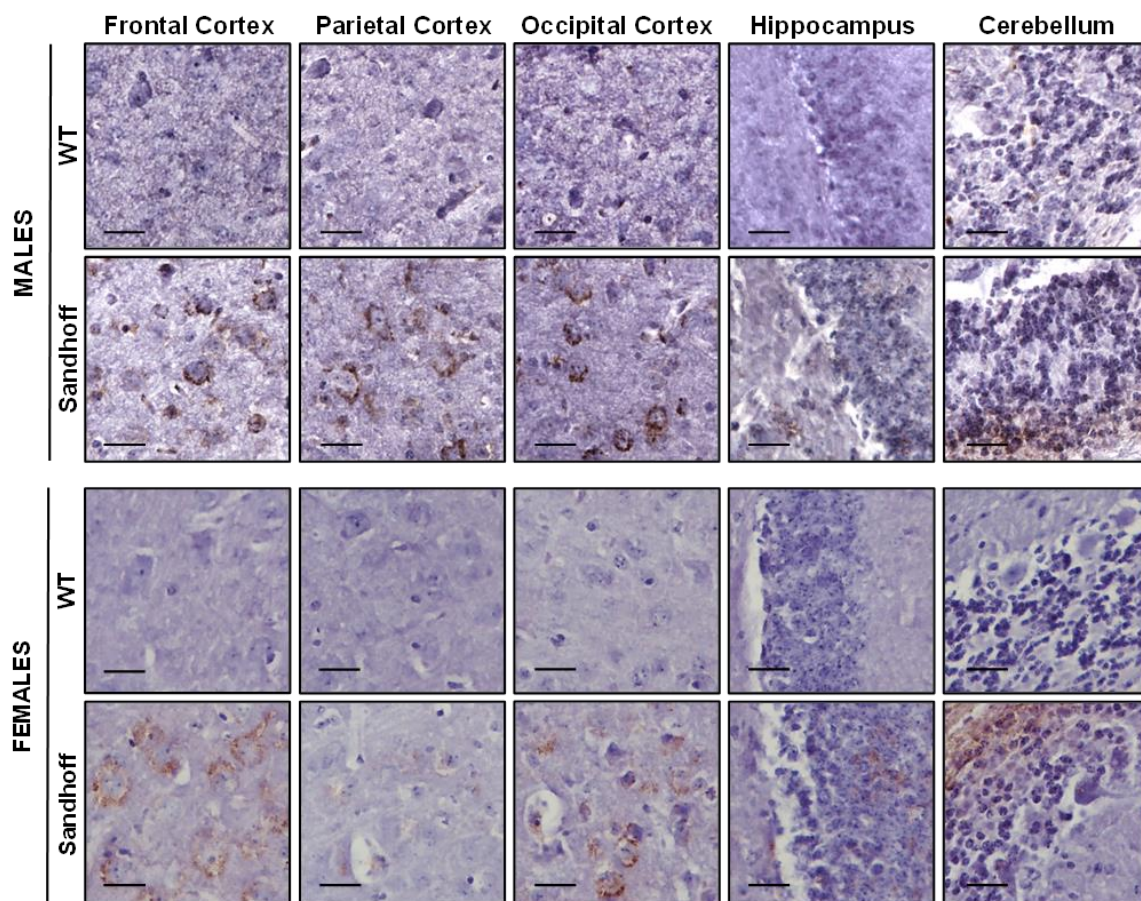


Figura 18. Acumulació del gangliòsid GM2 a l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff. Imatges representatives de la immunohistoquímica contra el GM2 obtingudes de diferents regions de l'encèfal dels ratolins mascles i femelles WT i Sandhoff a 1 mes d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 25 µm.

2.2.2. Acumulació secundària del colesterol no esterificat a l'encèfal

L'acumulació primària del gangliòsid GM2 als lisosomes dona lloc a d'altres acumulacions secundàries, com per exemple, del colesterol (Breiden, 2019). Tot i que els nivells de colesterol total al SNC aparentment no estan alterats a les LSD, les anàlisis histològiques de seccions d'encèfal han mostrat que la tinció de filipina, una molècula fluorescent que s'uneix específicament al colesterol no esterificat, permet detectar l'acumulació de colesterol als cossos cel·lulars de les neurones i la glia en un ampli espectre de LSDs, incloses la Niemann-Pick tipus C, les gangliosidosis GM1 i GM2 i les MPSs tipus I, II, IIIA i VI (Walkley, 2009). Així doncs, es va realitzar un estudi mitjançant la tinció de filipina a les seccions de l'encèfal dels ratolins mascles i femelles, WT i Sandhoff a d'un mes d'edat. D'acord amb el que es va observar a l'anàlisi immunohistoquímica contra el gangliòsid GM2, els ratolins WT no presentaven marcatge positiu per la filipina a l'encèfal ni dels mascles ni de les femelles (Figura 19). En canvi,

els animals Sandhoff a d'un mes d'edat ja presentaven una acumulació molt evident de colesterol no esterificat de forma generalitzada a tot l'encèfal en ambdós sexes (Figura 19).

Per tant, l'acumulació primària del gangliòsid GM2 provoca, en segon terme, l'acumulació secundària del colesterol no esterificat al SNC del model murí de la malaltia de Sandhoff ja evident al mes d'edat.

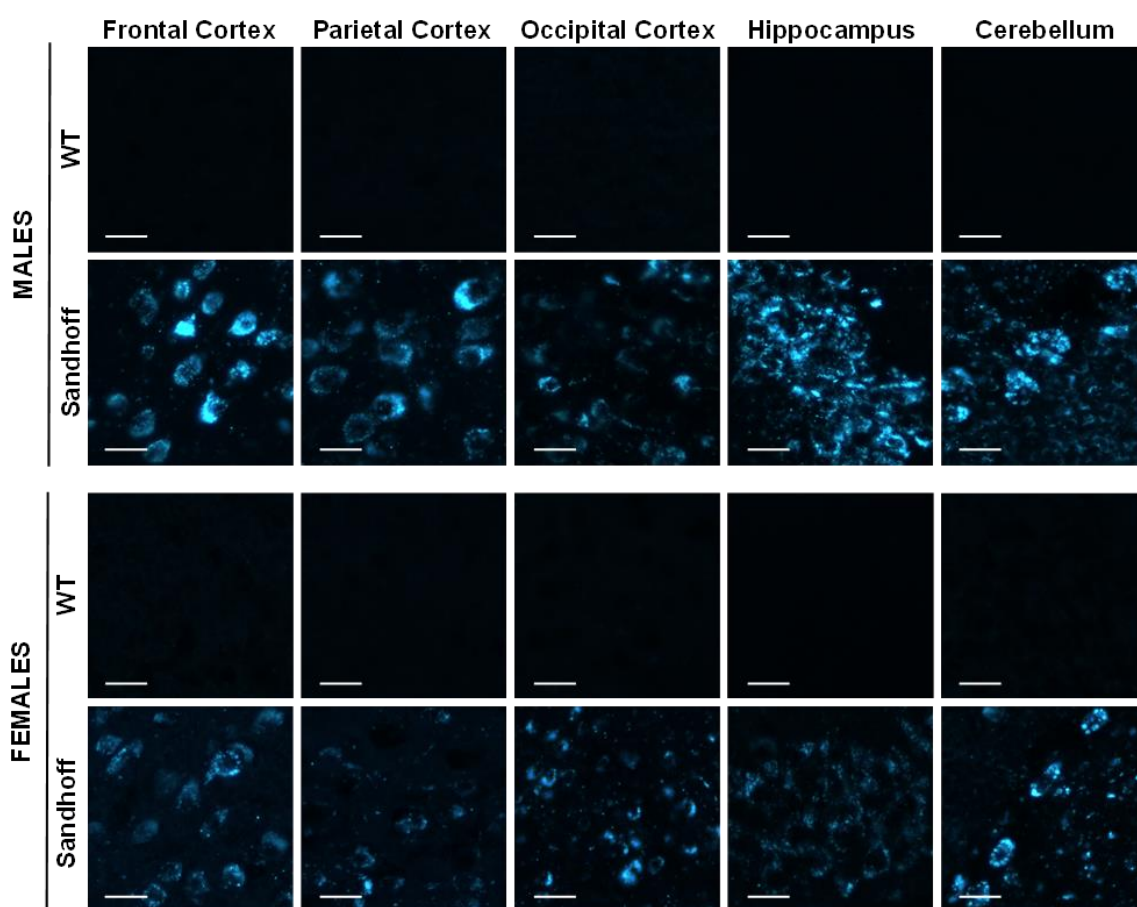


Figura 19. Acumulació secundària del colesterol no esterificat a l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff. Imatges representatives de la tinció de filipina obtingudes de diferents regions de l'encèfal dels ratolins mascles i femelles WT i Sandhoff a 1 mes d'edat. Imatges representatives de 3 animals per grup. Barra d'escala: 25 µm.

2.2.3. Homeòstasi lisosòmica

2.2.3.1. Distensió lisosòmica

Una acumulació patològica de molècules no degradades als lisosomes, com el gangliòsid GM2 o el colesterol no esterificat, provoca la distensió lisosòmica, una alteració freqüent en les LSDs causat per l'augment de la mida i/o el número d'aquests orgànuls (Ferreira, 2017). La distensió lisosòmica es va avaluar a les seccions de l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff a un mes d'edat mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna LIMP2, present a les membranes lisosòmiques i, com a conseqüència, un bon marcador de la distensió lisosòmica. Similar a l'acumulació primària del gangliòsid GM2 i secundària del colesterol no esterificat, els ratolins mascles i femelles Sandhoff van mostrar un augment significatiu de la intensitat de senyal de LIMP2 en la majoria de regions de l'encèfal analitzades, en comparació amb els animals WT (Figura 20).

Aquests resultats van demostrar que l'acumulació del gangliòsid GM2 i el colesterol no esterificat van provocar un increment de la mida i/o el número de les vesícules lisosòmiques, fet que indica que la distensió lisosòmica ja és present a un mes d'edat al model murí de la malaltia de Sandhoff.

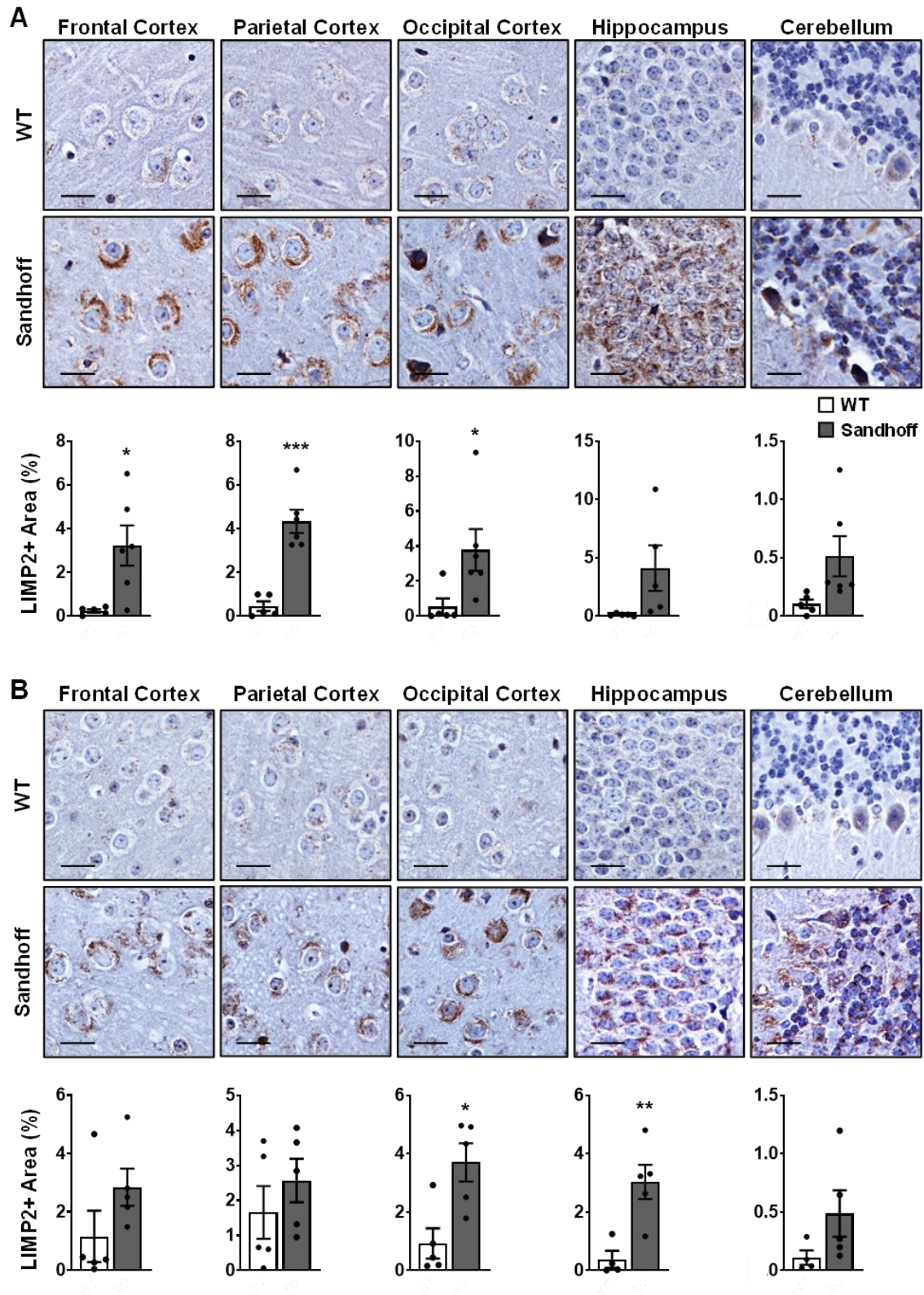


Figura 20. Distensió del compartiment lisosòmic a l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff. (A, B) Avaluació de la mida del compartiment lisosòmic mitjançant la immunohistoquímica contra la proteïna LIMP2 als ratolins mascles (A) i femelles (B) WT i Sandhoff a 1 mes d'edat. Imatges representatives obtingudes de diverses regions de l'encèfal. Barra d'escala: 25 µm. Sota les imatges es representa la quantificació del percentatge d'àrea positiva de LIMP2 de 4 imatges obtingudes de cada regió analitzada. Els resultats s'expressen com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. WT.

2.2.3.2. Desregulació enzimàtica

A la majoria de LSDs, l'acumulació de substrats no degradats a l'interior del lisosoma, com a conseqüència d'una deficiència proteica, genera una alteració de l'homeòstasi lisosòmica que causa alteracions secundàries en el funcionament d'altres enzims lisosòmics (Ribera, 2015; Sardiello, 2009). Per avaluar l'efecte de l'acumulació del gangliòsid GM2 en l'homeòstasi del lisosoma, l'activitat de diferents enzims lisosòmics com la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), la β -glucuronidasa (GUSB), l'heparan- α -glucosaminida-N-acetiltransferasa (HGSNAT), la α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU) i la N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH) es va mesurar en els extractes proteics de l'encèfal dels ratolins WT i Sandhoff a un mes d'edat.

Els ratolins Sandhoff, a aquesta edat primerenca, ja presentaven un augment significatiu de l'activitat dels diferents enzims lisosòmics com la GALNS, la GUSB, la NAGLU i la SGSH, en comparació als ratolins WT; mentre que l'activitat HGSNAT detectada disminuïa, en ambdós sexes (Figura 21). Aquests dades van evidenciar una forta alteració de l'homeòstasi del lisosoma a l'encèfal dels ratolins Sandhoff, com a conseqüència de l'acumulació patològica primària i secundària, que ja era evident a un mes d'edat.

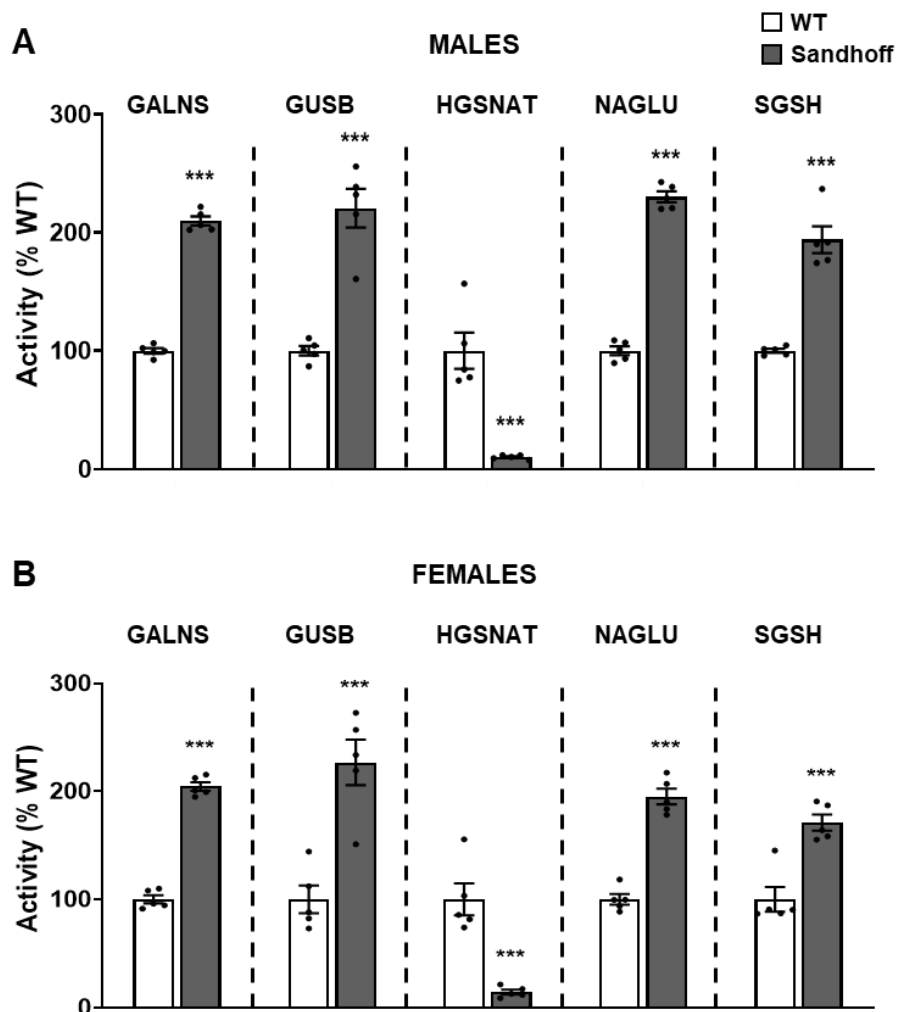


Figura 21. Alteració de l'homeòstasi del lisosoma a l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff. (A, B) Determinació de l'activitat dels enzims lisosòmics GALNS, GUSB, HGSNAT, NAGLU i SGSH als extractes proteics de l'encèfal dels ratolins mascles (A) i femelles (B) WT i Sandhoff a 1 mes d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. *** $p < 0.001$ vs. WT.

2.2.4. Anàlisi de la neuroinflamació: Astrocitosi

Els astròcits són un tipus cel·lular que en condicions no patològiques, tenen funcions de suport metabòlic a les neurones; ara bé, una vegada s'activen a causa de processos inflamatoris, també participen en la regulació de les respostes inflamatòries i tenen un paper important en la progressió i la gravetat dels trastorns neurològics. La conversió dels astròcits cap a un estat reactiu s'anomena astrocitosi (Ogawa, 2017). Per aquest motiu, es va analitzar l'astrocitosi mitjançant una anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna àcida fibril·lar glial (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) a diferents regions de l'encèfal dels ratolins WT i Sandhoff a un mes d'edat. La GFAP és la proteïna principal del filament intermedi als astròcits madurs i, també, un component important del citoesquelet dels astròcits durant el desenvolupament (Middeldorp, 2011). A totes les

regions de l'encèfal analitzades dels ratolins mascles i femelles Sandhoff, es van observar més astròcits, detectats pel marcatge positiu per a la GFAP en comparació amb els observats als animals WT (Figura 22). Per tant, a un mes d'edat, el model murí de la malaltia de Sandhoff ja presentava indicis clars de neuroinflamació.

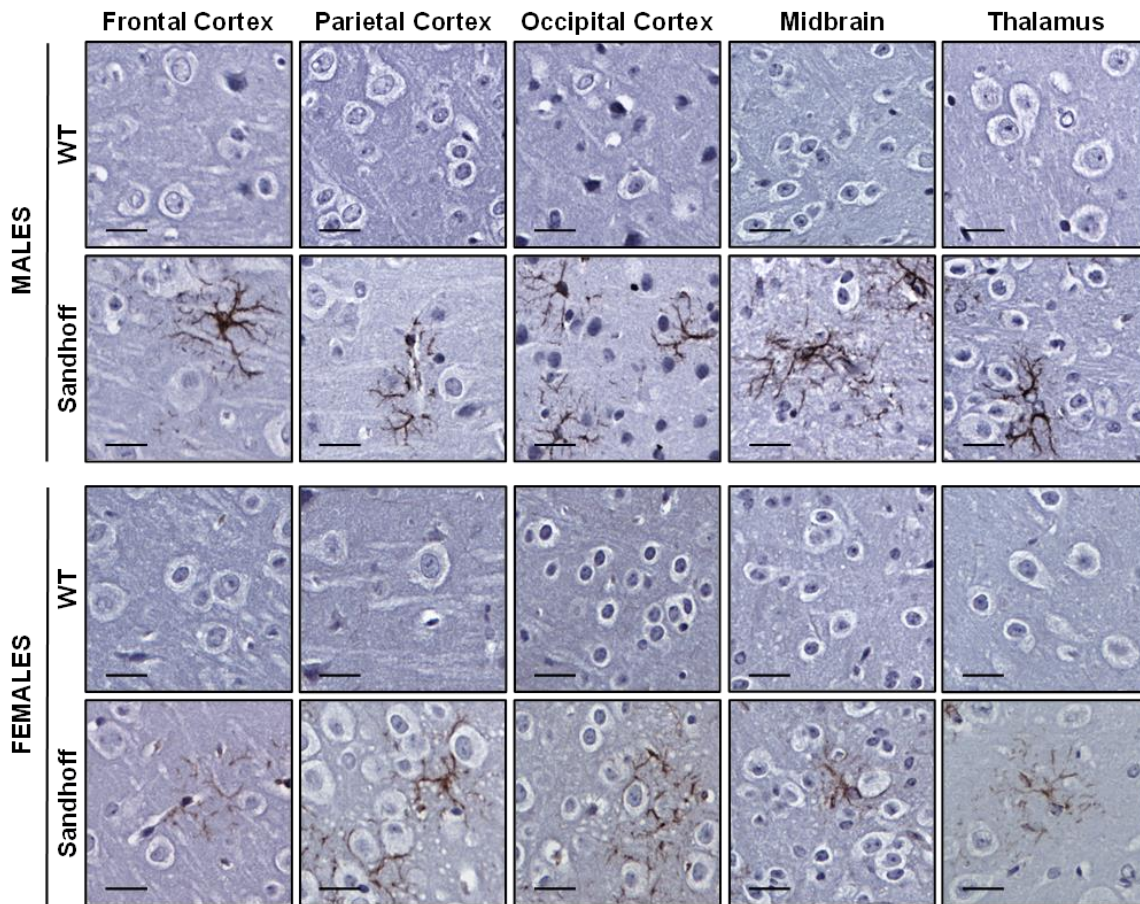


Figura 22. Caracterització de l'astrocitosi a l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff. Anàlisi de l'astrocitosi a diferents regions de l'encèfal mitjançant la immunohistoquímica contra el marcador d'astròcits GFAP als ratolins mascles i femelles WT i Sandhoff a 1 mes d'edat. Imatges representatives obtingudes de diverses regions de l'encèfal. Barra d'escala: 25 µm.

En conjunt, aquests resultats ens mostraven que el model murí de la malaltia de Sandhoff desenvolupava les característiques principals de la patologia al SNC a una edat molt primerenca, als dos sexes. Així doncs, un mes d'edat podria representar un moment adequat per tal d'administrar una nova aproximació de teràpia gènica i determinar si és capaç de reverir la malaltia ja establerta.

***Part 2. Desenvolupament d'una aproximació
de teràpia gènica per a la malaltia de
Sandhoff i Tay-Sachs***

1. DISENY I CONSTRUCCIÓ DELS VECTORS CODIFICANTS PER LES SUBUNITATS α I β DE LA β -HEXOSAMINIDASA UNIDES

Després de la caracterització de la patologia del SNC i observar que ja era present a un mes d'edat al model de ratolí de la malaltia de Sandhoff, es va desenvolupar una nova aproximació de teràpia gènica pel tractament tant de la malaltia de Sandhoff com també per Tay-Sachs. Per aquest motiu, es van dissenyar diferents constructes duals que codifiquessin alhora per les dues subunitats de l'enzim HEXA ($\alpha\beta$) unides entre elles per diferents seqüències peptídiques *linker*. D'aquesta manera, es podria obtenir una relació equimolar d'ambdues subunitats (α i β) a totes les cèl·lules transduïdes i aconseguir l'expressió de l'isoforma HEXA ($\alpha\beta$), l'únic enzim capaç de degradar el gangliòsid GM2.

El disseny d'un constructe dual permetria reduir la dosi administrada als pacients a la meitat, en comparació amb l'administració de dos vectors individuals separats, ja que un sol vector contindria ambdós gens, *HexA* i *HexB*. A més a més, la producció i purificació d'un únic vector, a una menor dosi, permetria abaratir els costos, sempre comparant-ho amb la producció de dos vectors independents, que codifiquen cadascun d'ells pels gens *HexA* i *HexB* individualment .

Com que els nous constructes duals dissenyats s'havien d'encapsidar en un vector AAV, era imprescindible tenir en compte que la seva mida no podia excedir les 4,7 Kb. Per això, es va escollir el promotor d'expressió ubiqua Cbh, una versió més curta del promotor CAG àmpliament utilitzat en teràpia gènica, el qual està format per l'enhancer del citomegalovirus (CMV), el promotor de la β -actina de pollastre i un intró quimèric de la β -actina (Gray, 2011). Com a seqüència de poliadenoliació (poliA), es va utilitzar la cua de poliadenilació del virus simi 40 (simian virus 40, SV40). Ambdues seqüències, tant el promotor Cbh com el poliA SV40, es van clonar al plasmidi pAAV-MCS (*multiple cloning site*, MCS), que contenia les ITRs del genoma de l'AAV2 juntament amb un espai de clonatge per a les seqüències d'interès. D'aquesta manera, es va generar el plasmidi anomenat pAAV-Cbh-SV40, que també s'anomenarà com a constructe *Null*, ja que no porta cap gen d'interès (Figura 23A).

Com a grup control utilitzarem els vectors AAV9 individuals, que codifiquen en vectors diferents els dos gens. Es van utilitzar les seqüències codificants dels gens *HexA* i *HexB* murins optimitzades (*omHexA* i *omHexB*), per augmentar-ne l'expressió. Cada un d'ells es va clonar dins el plasmidi pAAV-Cbh-SV40, generant els plasmidis anomenats pAAV-Cbh-*omHexA*-SV40 i pAAV-Cbh-*omHexB*-SV40 (Figura 23B).

Pel disseny dels constructes duals, que tenien els dos gens units per un *linker*, es van utilitzar tres *linkers* curts, anomenats L1, L2 i L3. Els *linkers* són seqüències peptídiques curtes que de forma natural es troben entre dominis proteics, tot i que també són utilitzats per generar proteïnes de fusió (Chen, 2013). Els *linkers* generats per aquest estudi tenien una llargada de: L1, 20 aminoàcids (aa); L2, 33 aa; i L3, 12 aa. El *linker* L1 està basat en una sèrie de glicines i serines. La combinació d'aquests residus flexibles i hidròfils permet evitar la formació d'estructures secundàries i redueix la probabilitat que interfereixin amb el plegament i la funció dels dominis proteics. Aquest tipus de *linker* ha estat àmpliament utilitzat en la generació de proteïnes de fusió (van Rosmalen, 2017). El linker L2 es tracta d'un *linker* molt flexible, i una mica més llarg, que s'ha utilitzat esporàdicament en la fusió d'altres tipus de proteïnes (Tong, 2021). Està format per glicines i serines juntament amb altres aminoàcids com l'àcid glutàmic, la prolina, l'alanina i la treonina. Finalment, el linker L3 és el més curt, molt flexible i amb una seqüència d'aminoàcids poc voluminosos i no hidrofòbics, que eviten repeticions utilitzant diferents combinacions de glicines, serines, alanines i treonines (Waldo, 1999).

Aquests *linkers* es van utilitzar per fusionar les versions murines optimitzades dels gens *HexA* i *HexB*, per tal d'expressar simultàniament ambdues subunitats proteiques en una proporció equimolar i produir eficientment l'isoenzim HEXA. Per una banda, es van generar tres constructes on s'expressava, en primer lloc, el gen murí optimitzat de l'*HexA* i, posteriorment, el gen murí optimitzat de l'*HexB* fusionats amb un dels tres *linkers*: pAAV-Cbh-*omHexA*-L1-*omHexB*-SV40, pAAV-Cbh-*omHexA*-L2-*omHexB*-SV40 i pAAV-Cbh-*omHexA*-L3-*omHexB*-SV40 (Figura 23C). Per altra banda, també es van fusionar les versions murines optimitzades dels gens *HexA* i *HexB* en l'ordre invers per generar els següents constructes: pAAV-Cbh-*omHexB*-L1-*omHexA*-SV40, pAAV-Cbh-*omHexB*-L2-*omHexA*-SV40 i pAAV-Cbh-*omHexB*-L3-*omHexA*-SV40 (Figura 23D).

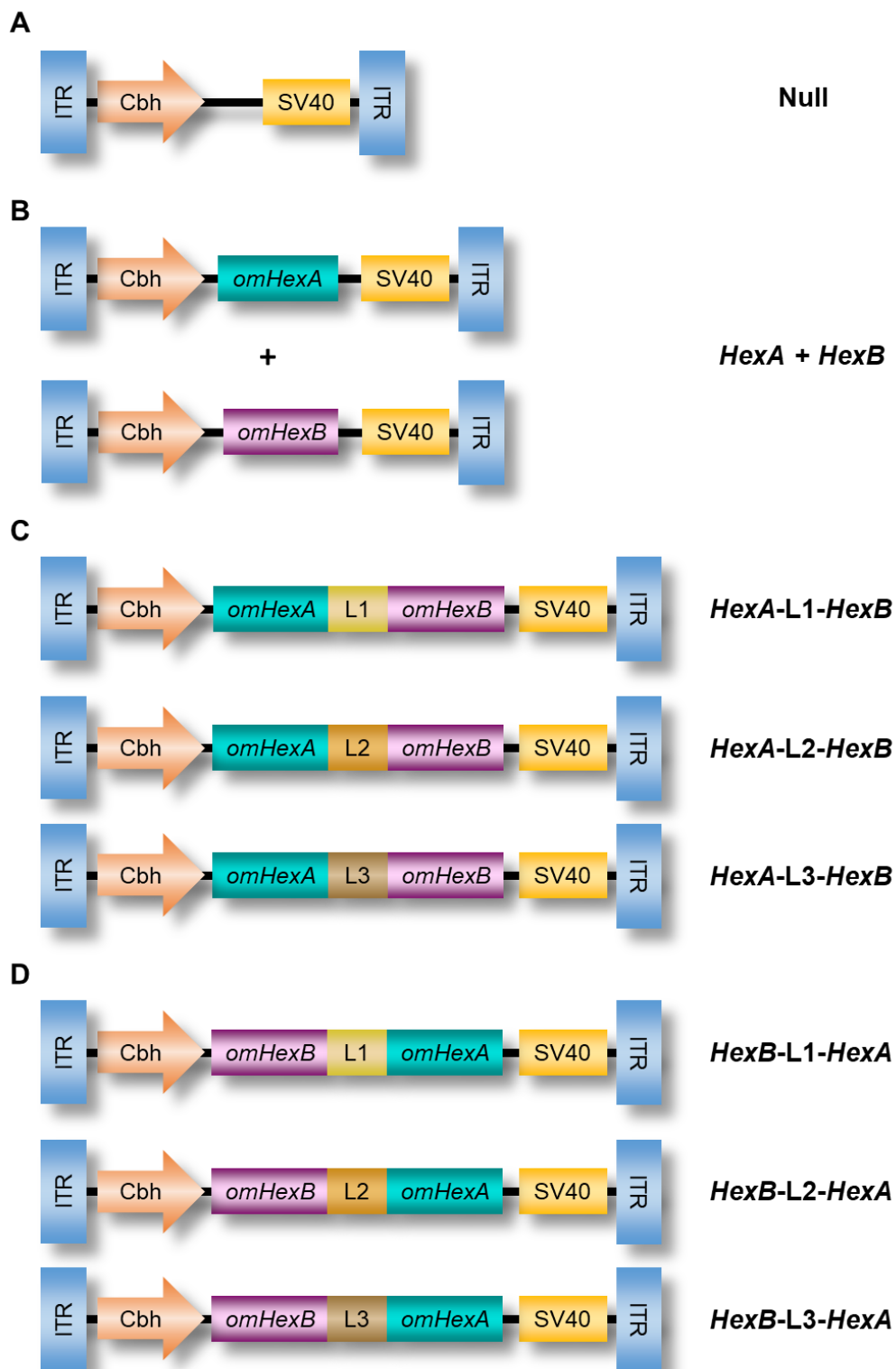


Figura 23. Representació esquemàtica dels constructes AAV. (A-C) Tots els constructes consten d'un promotor d'expressió ubiqüa, el Cbh, i una cua de poliadenilació del SV40, els quals estan flanquejats per les ITRs de l'AAV2. **(A)** El constructe *Null* no conté cap seqüència codificant. **(B)** HexA + HexB són dos constructes individuals separats. **(C)** *HexA-L1-HexB*, *HexA-L2-HexB* i *HexA-L3-HexB* són tres constructes duals diferents que contenen primer el gen optimitzat *HexA* murí unit al gen optimitzat *HexB* murí a través dels següents *linkers*: L1, L2 i L3. **(D)** Els constructes *HexB-L1-HexA*, *HexB-L2-HexA* i *HexB-L3-HexA* consten primer del gen optimitzat *HexB* murí unit al gen optimitzat *HexA* murí mitjançant els *linkers*: L1, L2 i L3.

1.1. Estudi *in vitro* per determinar l'eficiència dels diferents constructes duals

Per tal d'avaluar els constructes duals i la seva capacitat de produir l'HEXA actiu, es va transfectar la línia cel·lular HEK-293 amb els següents plasmidis:

pAAV-Cbh-*omHexA-L1-omHexB-SV40*

pAAV-Cbh-*omHexA-L2-omHexB-SV40*

pAAV-Cbh-*omHexA-L3-omHexB-SV40*

pAAV-Cbh-*omHexB-L1-omHexA-SV40*

pAAV-Cbh-*omHexB-L2-omHexA-SV40*

pAAV-Cbh-*omHexB-L3-omHexA-SV40*

Després de 48h de la transfecció, es van recollir les cèl·lules i el medi cel·lular per procedir a la determinació de l'activitat β -HEXO (HEXA, HEXB i HEXS) i HEXA (HEXA i HEXS). En el cas dels constructes *HexA-Linker-HexB*, la transfecció va donar lloc a un augment molt significatiu de l'activitat β -HEXO (on es té en compte l'activitat dels tres isoenzims HEXA, HEXB i HEXS), tant en els extractes cel·lulars com en el medi cel·lular, en comparació amb les cèl·lules no transfectades (Figura 24A i B). Es va observar un patró similar després de mesurar l'activitat HEXA (determina l'activitat dels isoenzims HEXA i HEXS) (Figura 24C i D). En el cas dels constructes amb l'ordre de gens invers, *HexB-Linker-HexA*, no es va detectar cap augment de les activitats β -HEXO ni HEXA, comparat amb les cèl·lules no transfectades (Figura 24).

Aquests resultats van demostrar que els constructes amb l'ordre *HexA-Linker-HexB* van produir un enzim actiu i funcional, que era capaç de ser secretat al medi extracel·lular, crucial pel fenomen de la correcció creuada. En canvi, els constructes amb ordre invers *HexB-Linker-HexA* no eren capaços de generar un enzim funcional.

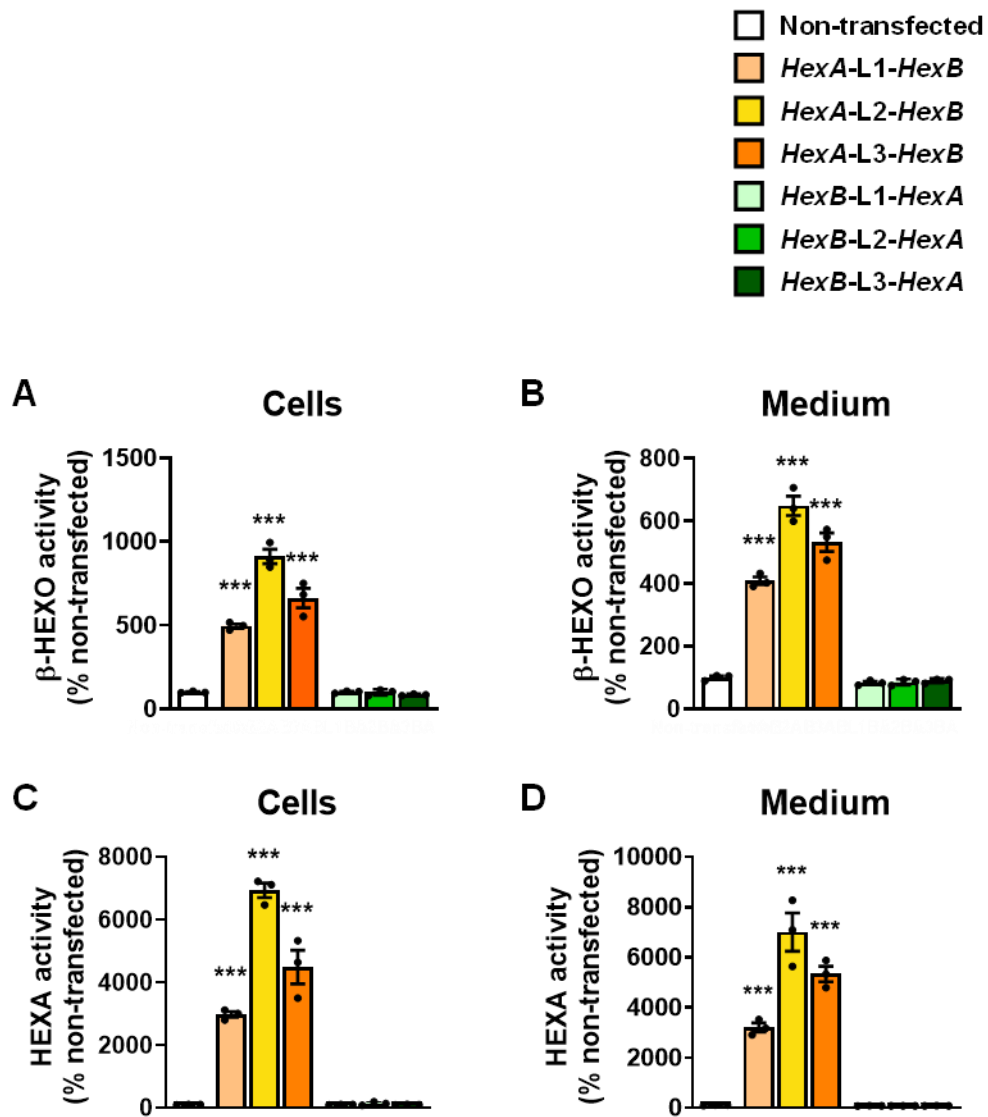


Figura 24. Activitat β -HEXO i HEXA després de la transfecció de les cèl·lules HEK293 amb els plasmidis codificants per l'*omHexA* i *omHexB* units pels *linkers*. (A-D) Les cèl·lules HEK293 es van transfectar amb 0.8 μ g dels següents plasmidis: *pHexA-L1-HexB*, *pHexA-L2-HexB*, *pHexA-L3-HexB*, *pHexB-L1-HexA*, *pHexB-L2-HexA* i *pHexB-L3-HexA*. Determinació de l'activitat β -HEXO a les cèl·lules (A) i al medi cel·lular (B) i l'activitat HEXA a les cèl·lules (C) i al medi cel·lular (D) 48h després de la transfecció. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 3 pous per grup. *** $p < 0.001$ vs. cèl·lules no transfectades.

2. OBTENCIÓ DELS VECTORS VIRALS ADENOASSOCIATS DE SEROTIP 9

L'AAV9 és un serotip amb una molt bona eficiència de transducció tant al SNC com al fetge (Ozlu, 2021). Diversos resultats obtinguts al nostre laboratori han demostrat que el vector viral AAV9 administrat directament al LCR, a través de la cisterna magna, té una àmplia distribució i una elevada transducció al SNC, fins i tot a regions distals al punt d'injecció (Haurigot, 2013b). A més a més, part dels vectors AAV9 presents al LCR, drenen a la torrent circulatori i poden transduir eficientment també el fetge (Haurigot, 2013b; Motas, 2016; Ribera, 2015; Roca, 2017). D'aquesta forma, el fetge és capaç de produir i secretar les proteïnes lisosòmiques al torrent sanguini, les quals poden arribar a les cèl·lules d'altres òrgans perifèrics no transduïts pel vector viral AAV9, gràcies als receptors de manosa 6-fosfat ubicats a la membrana plasmàtica de les cèl·lules. Aquest fenomen, conegut com a correcció creuada, ofereix una gran avantatge a les aproximacions de teràpia gènica per al tractament de les malalties que afecten a totes les cèl·lules de l'organisme, ja que no és necessari corregir el defecte genètic a totes elles per a aconseguir un benefici terapèutic generalitzat.

Per aquest motiu, es va decidir generar els nostres vectors AAV duals amb el serotip AAV9. Els resultats de la transfecció cel·lular amb els diferents plasmidis duals van indicar que únicament els constructes amb l'ordre *HexA-Linker-HexB* eren capaços de produir un enzim HEXA ($\alpha\beta$) actiu. Per tant, es van generar únicament els vectors virals AAV9 amb els següents constructes:

AAV9-Cbh-SV40

AAV9-Cbh-*omHexA*-SV40

AAV9-Cbh-*omHexB*-SV40

AAV9-Cbh-*omHexA-L1-omHexB*-SV40

AAV9-Cbh-*omHexA-L2-omHexB*-SV40

AAV9-Cbh-*omHexA-L3-omHexB*-SV40.

3. ESTUDI *IN VIVO* PER DETERMINAR EL MILLOR VECTOR AAV9 DUAL PER AL TRACTAMENT DE LA MALALTIA DE SANDHOFF

Tal com s'ha demostrat a la primera part d'aquesta tesi, el model murí de la malaltia de Sandhoff a un mes d'edat presentava una patologia ben establerta al SNC, amb una gran acumulació primària del gangliòsid GM2 i secundària del colesterol no esterificat, alteracions marcades de l'homeòstasi lisosòmica i una manifesta astrocitosi, juntament amb una reducció de l'esperança de vida a només uns 4,3 mesos d'edat.

A continuació, es va estudiar si els 3 vectors AAV9 duals generats eren actius *in vivo*. Així, es va desenvolupar una aproximació de teràpia gènica basada en l'administració a la cisterna magna dels vectors AAV9 duals, codificants pels gens *omHexA* i *omHexB* units per un *linker*. Com a animals controls es van utilitzar els ratolins WT, els Sandhoff no tractats i els Sandhoff injectats amb el vector *Null*. Els vectors AAV9 es van administrar als ratolins Sandhoff d'un mes d'edat a una dosi total d' 1×10^{11} vg/animal. Aquests animals es van eutanasiar als 4 mesos d'edat per tal d'avaluar l'eficàcia terapèutica dels diferents vectors AAV9 *in vivo*, mitjançant la determinació de les activitats β -hexosaminidasa i l'avaluació de l'acumulació del gangliòsid GM2 (Figura 27).

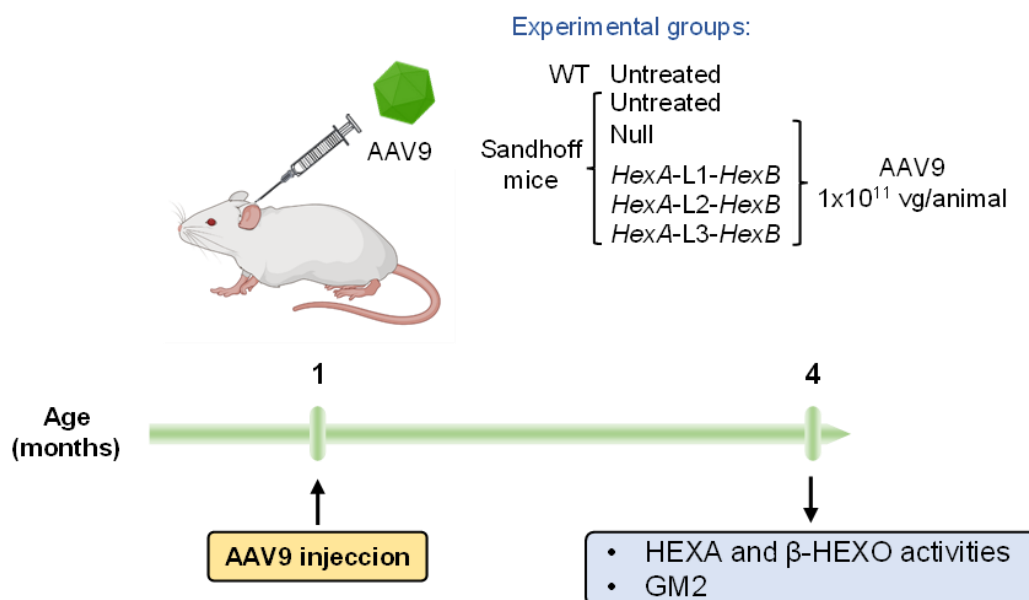


Figura 27. Disseny experimental. Els vectors AAV9 (*Null*, *HexA-L1-HexB*, *HexA-L2-HexB* i *HexA-L3-HexB*) es van administrar per via intracisterna magna al LCR dels ratolins mascles i femelles Sandhoff a un mes d'edat. Els vectors AAV9 es van administrar a una dosi d' 1×10^{11} vg/animal. Com a grups control, es van utilitzar els ratolins WT, Sandhoff no tractats o tractats amb el vector *Null*. Per tal d'avaluar l'efecte del tractament, es van eutanasiar els ratolins 3 mesos després de l'administració dels vectors virals i es va determinar l'efecte del tractament en les activitats β -hexosaminidasa i en l'acumulació del gangliòsid GM2.

3.1. Estudi de l'activitat enzimàtica al SNC

En primer lloc, es va determinar si, tres mesos després de l'administració, l'aproximació terapèutica era capaç de recuperar l'expressió de l'activitat de l'enzim HEXA al SNC. Per aquest motiu, es van analitzar les dues activitats no específiques, l'activitat β -HEXO i l'HEXA, a diferents regions de l'encèfal dels ratolins WT, Sandhoff no tractats i tractats amb els vectors AAV9 duals. Tal com s'esperava, els ratolins Sandhoff no tractats o injectats amb el vector *Null* presentaven uns nivells d'activitat β -HEXO i HEXA pràcticament indetectables (Figura 28). L'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals codificants per om*HexA* i om*HexB* units pels *linkers* L1, L2 o L3 va resultar en un augment de l'activitat β -HEXO i HEXA, a uns nivells similars o, fins i tot en alguns casos, superiors als nivells d'activitat dels animals WT (Figura 28).

Es va observar una àmplia i homogènia distribució de la proteïna a les diferents regions analitzades, fins i tot, a les zones més allunyades del punt d'injecció dels vectors (Figura 28).

Tot i que els 3 vectors AAV9 duals eren actius *in vivo*, mostrant un augment de les activitats β -hexosaminidases, en general, el vector *HexA-L2-HexB* va presentar uns nivells d'activitat β -HEXO i HEXA menors a tot l'encèfal, respecte als valors obtinguts amb els vectors *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB* (Figura 28).

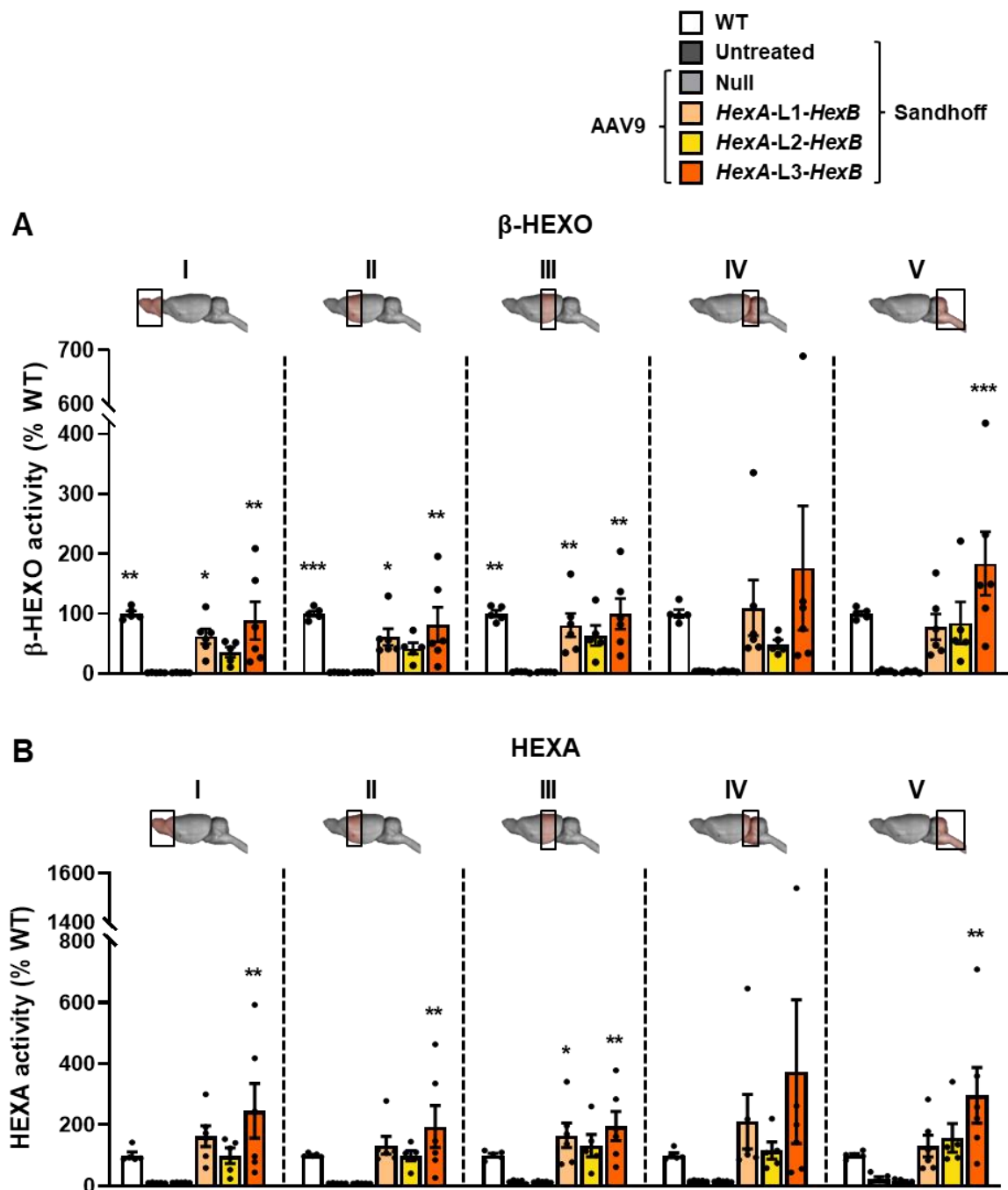


Figura 28. Activitat β -HEXO i HEXA a l'encèfal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) a diferents regions de l'encèfal (I-V) de ratolins femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una dosi d' 1×10^{11} vg/animal d'un vector AAV9 (*HexA-L1-HexB*, *HexA-L2-HexB*, *HexA-L3-HexB* o *Null*) administrat directament al LCR per via intracisterna magna, i es van analitzar als 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5-6 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

L'administració intra-LCR també permet transduir eficientment el fetge, el qual és capaç de produir i secretar els enzims lisosòmics al torrent sanguini. Per tant, es van determinar les activitats enzimàtiques β -HEXO i HEXA a les mostres del fetge i el sèrum dels ratolins WT i Sandhoff no tractats o injectats amb el vector AAV9 *Null* o amb els vectors AAV9 duals. En els ratolins tractats amb els vectors AAV9 duals, es va detectar un augment de l'activitat β -HEXO i HEXA, tant al fetge com al sèrum, de com a mínim el 200% de l'activitat dels animals WT. L'augment d'activitat més marcat, tant al fetge com al sèrum, es va detectar als ratolins Sandhoff tractats amb el vector AAV9 *HexA-L3-HexB* (Figura 29).

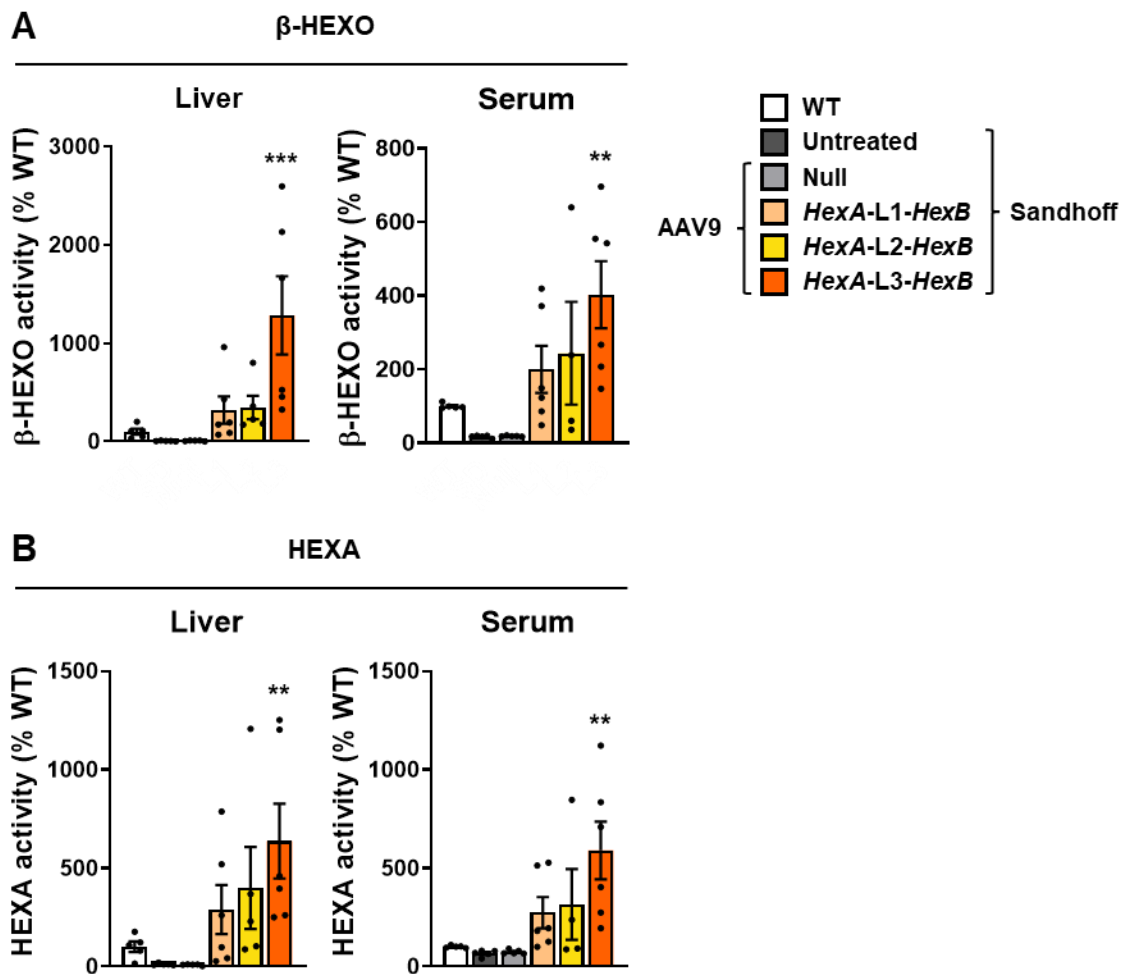


Figura 29. Activitat β -HEXO i HEXA al fetge i al sèrum dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) al fetge i al sèrum de ratolins femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una dosi d' 1×10^{11} vg/animal d'un vector AAV9 (*HexA-L1-HexB*, *HexA-L2-HexB*, *HexA-L3-HexB* o *Null*) administrat directament al LCR per via intracisterna magna, i es van analitzar als 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5-6 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

3.2. Reducció de l'acumulació del gangliòsid GM2

A continuació, tres mesos després de l'administració es va valorar també l'efecte del tractament a l'acumulació primària del gangliòsid GM2 mitjançant una immunohistoquímica contra GM2 als talls histològics de l'encèfal dels ratolins WT, Sandhoff no tractats i tractats amb els diferents vectors AAV9 duals. Als ratolins tractats amb *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB*, es va detectar una reversió completa de l'acumulació del gangliòsid GM2 a totes les regions de l'encèfal analitzades, en comparació amb els ratolins Sandhoff no tractats en els quals es va detectar una forta senyal positiva del GM2 (Figura 30). En canvi, als animals tractats amb *HexA-L2-HexB*, es va observar una correcció generalitzada a la majoria de regions analitzades, exceptuant al còrtex parietal on hi havia la presència d'un conjunt de cèl·lules amb acumulació del gangliòsid GM2 (Figura 30).

En conjunt, aquests resultats van demostrar una molt bona eficàcia terapèutica dels vectors AAV9 duals usant un *linker* per generar una única proteïna HEXA capaç d'eliminar l'acumulació del gangliòsid GM2, tot i que el vector AAV9 *HexA-L2-HexB* no era suficient per a revertir tota l'acumulació del gangliòsid GM2 a totes les regions de l'encèfal (Figura 30).

Com que els resultats demostraven que els vectors *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB* funcionaven lleugerament millor que el vector *HexA-L2-HexB*, es van seleccionar els vectors AAV9 duals amb els *linkers* L1 i L3 per continuar amb l'estudi d'avaluació de l'efecte terapèutic d'aquesta estratègia de teràpia gènica.

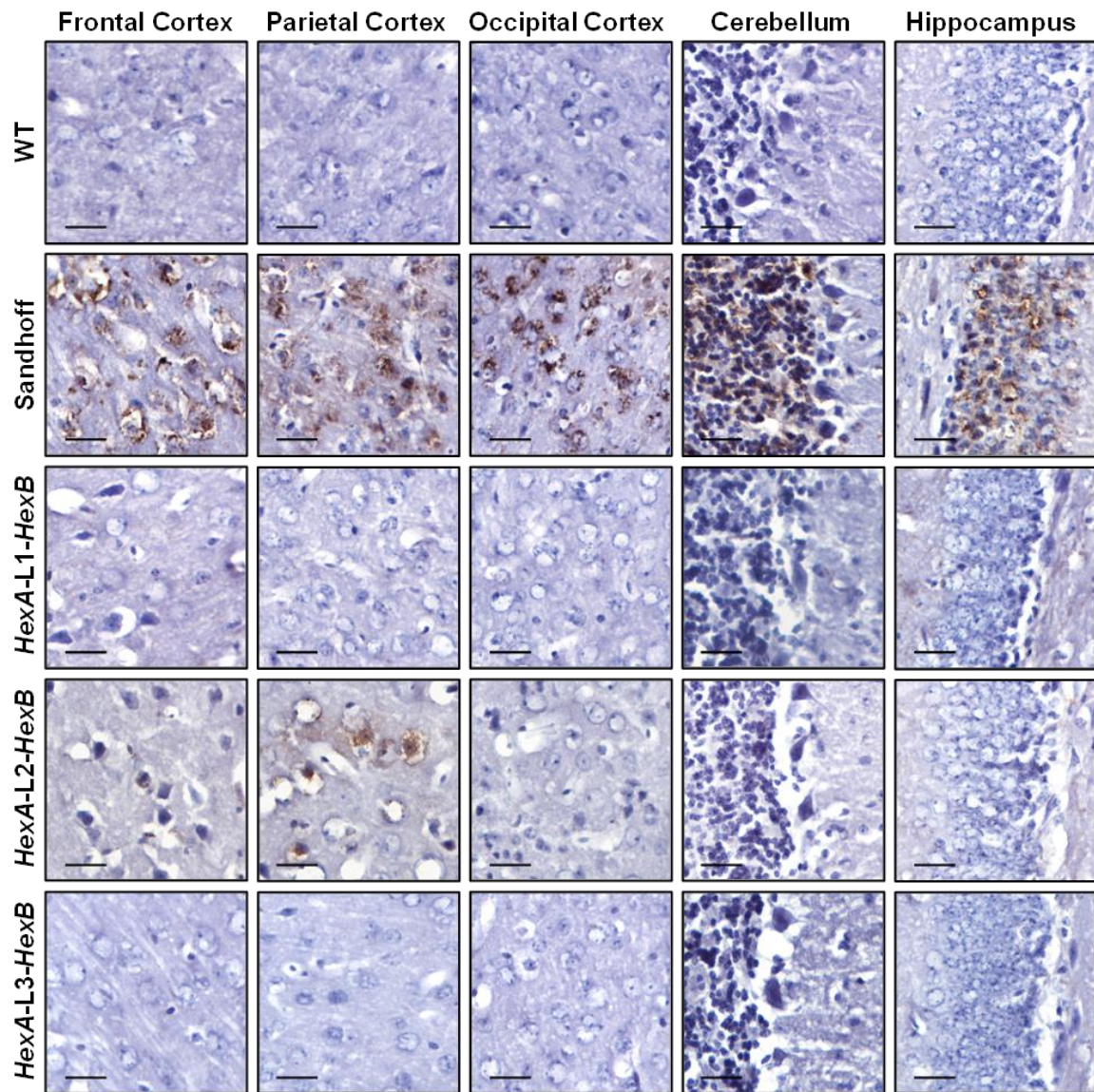


Figura 30. Reducció de l'acumulació del gangliòsid GM2 a l'encèfal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. Estudi de l'acumulació del gangliòsid GM2, mitjançant la immunohistoquímica contra el GM2, a diferents regions de l'encèfal de ratolins mascles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una dosi d' 1×10^{11} vg/animal d'un vector AAV9 (*HexA-L1-HexB*, *HexA-L2-HexB*, *HexA-L3-HexB* o *Null*) administrat directament al LCR per via intracisterna magna, i es van analitzar als 4 mesos d'edat. Imatges representatives de 2-4 animals per grup. Barra d'escala: 25 μ m.

***Part 3. Estudi de l'eficàcia terapèutica dels
vectors duals per al tractament de la
malaltia de Sandhoff***

1. DISENY EXPERIMENTAL

A continuació, es va realitzar un estudi per avaluar, en més profunditat, l'eficàcia terapèutica d'una aproximació de teràpia gènica basa en l'ús dels vectors AAV9 duals *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB*. En concret, es va analitzar l'efecte d'aquest tractament a la patologia del SNC i somàtica del model murí de la malaltia de Sandhoff, com també el seu efecte a la supervivència i als dèficits locomotors, de coordinació i de comportament.

El disseny experimental d'aquest nou estudi d'eficàcia terapèutica es va basar en l'administració, novament, dels vectors AAV9 duals a la cisterna magna dels ratolins mascles i femelles Sandhoff a 1 més d'edat. Com a animals control, es van utilitzar ratolins sans WT (germans de camada dels animals Sandhoff) i Sandhoff no tractats, injectats amb el vector *Null*. També es van tractar amb els vectors individuals AAV9-*omHexA* i AAV9-*omHexB*, per tal de determinar si els vectors AAV9 duals eren més potents en revertir la malaltia. Els vectors AAV9 *Null* i duals (*HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB*) es van administrar a una dosi d' 1×10^{11} vg/ratolí. Els vectors individuals AAV9-*omHexA* i AAV9-*omHexB*, que es van injectar a una dosi d' 1×10^{11} vg/ratolí de cada vector resultant en una dosi total de 2×10^{11} vg/animal.

Per avaluar l'eficàcia terapèutica, es va analitzar el grau de correcció de la patologia als 4 mesos d'edat, una edat molt propera a la mediana de supervivència dels animals Sandhoff no tractats (Figura 17), mitjançant l'anàlisi de diferents paràmetres bioquímics i diversos estudis immunohistoquímics i de comportament (Figura 31). També, es va dur a terme una anàlisi del comportament a llarg termini (*rotarod*) i de la supervivència (Figura 31).

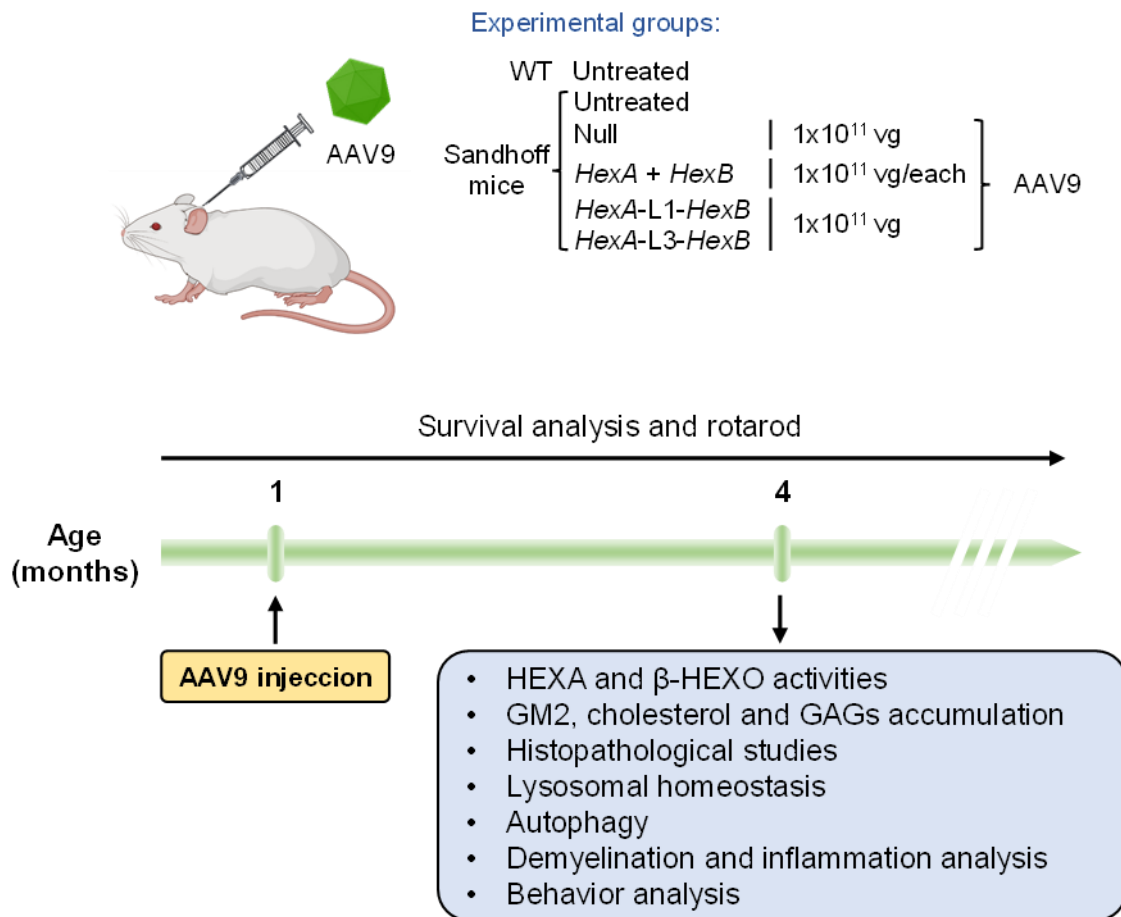


Figura 31. Disseny experimental. Els vectors AAV9 (*Null*, *HexA + HexB*, *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB*) es van administrar al LCR per via intracisterna magna als ratolins mascles i femelles Sandhoff a 1 mes d'edat. En el cas dels vectors AAV9 individuals, es van administrar 1x10¹¹ vg de cada vector per animal; mentre que els vectors AAV9 duals i *Null*, a una dosi de 1x10¹¹ vg/animal. Com a grups control, es van utilitzar els ratolins WT i Sandhoff no tractats o injectats amb el vector *Null* o els dos vectors AAV9 individuals (*HexA + HexB*). Tres mesos després de l'administració, una part dels ratolins de cada grup experimental es van eutanasiar per tal d'avaluar l'efecte del tractament a diferents paràmetres de la malaltia de Sandhoff. A la resta dels altres ratolins de cada grup experimental, es va dur a terme una anàlisi del comportament a llarg termini (*rotarod*) i la supervivència.

2. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUALS *HEXA-L-HEXB* EN LA PATOLOGIA DEL SNC

2.1. Estudi de l'activitat enzimàtica al SNC

Tres mesos després del tractament, es van mesurar les activitats β -HEXO i HEXA a l'encèfal dels ratolins WT, Sandhoff no tractats i tractats amb els vectors AAV9 individuals, duals o *Null*. Pel que fa a l'activitat β -HEXO, es va observar un augment dels nivells d'activitat en els ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals a totes les regions de l'encèfal analitzades, en comparació amb els animals tractats amb el vector AAV9 *Null* i no tractats (Figura 32A). En canvi, els nivells d'activitat obtinguts amb els vectors AAV9 individuals es va observar una distribució molt poc homogènia, a les dues regions més properes al punt d'injecció es va detectar una activitat similar al vector dual *HexA-L3-HexA*; mentre que a les tres regions de l'encèfal més allunyades van registrar nivells d'activitat molt més baixos (Figura 32A).

En femelles, ambdós vectors duals van resultar en un increment de l'activitat β -HEXO amb un patró molt similar a l'observat prèviament en mascles. Ara bé, les femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 individuals van mostrar uns nivells d'activitat més baixos i homogenis d'aproximadament del 25% l'activitat WT (Figura 33A).

En el cas de l'activitat HEXA, també es va observar un augment de l'activitat en els ratolins mascles i femelles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals a nivells similars a l'activitat dels animals WT (Figura 32B i 33B). En canvi, als ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors individuals, es va registrar una activitat HEXA molt menor a les regions de l'encèfal més allunyades al punt d'injecció, arribant a uns valors molt propers als dels animals Sandhoff no tractats o injectats amb *Null*; mentre que a les dues regions properes al punt d'injecció van presentar uns valors d'activitat HEXA més elevats, tot i això lleugerament inferiors als detectats amb ambdós vectors AAV9 duals (Figura 32B). Les femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 individuals van presentar uns nivells d'activitat HEXA molt baixos, propers als observats amb els Sandhoff no tractats o injectats amb *Null*, i molt homogenis a totes les regions de l'encèfal analitzades (Figura 33B).

En general, cal remarcar que els valors d'activitat β -HEXO i HEXA assolits amb els vectors AAV9 duals a totes les regions de l'encèfal analitzades, tant a les regions més distals com a les més properes al punt d'injecció, són força similars, tot indicant una àmplia i homogènia distribució del vector viral al SNC (Figura 32 i 33). Per tant, l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de la malaltia de

Sandhoff va conduir a un augment significatiu de les activitats β -hexosaminidasa a tot l'encèfal. A més, els animals Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals van assolir uns valors molt superiors, sobretot a l'activitat HEXA, més específica de l'enzim necessari per degradar el gangliòsid GM2, en comparació amb els resultats obtinguts amb l'administració dels dos vectors AAV9 individuals.

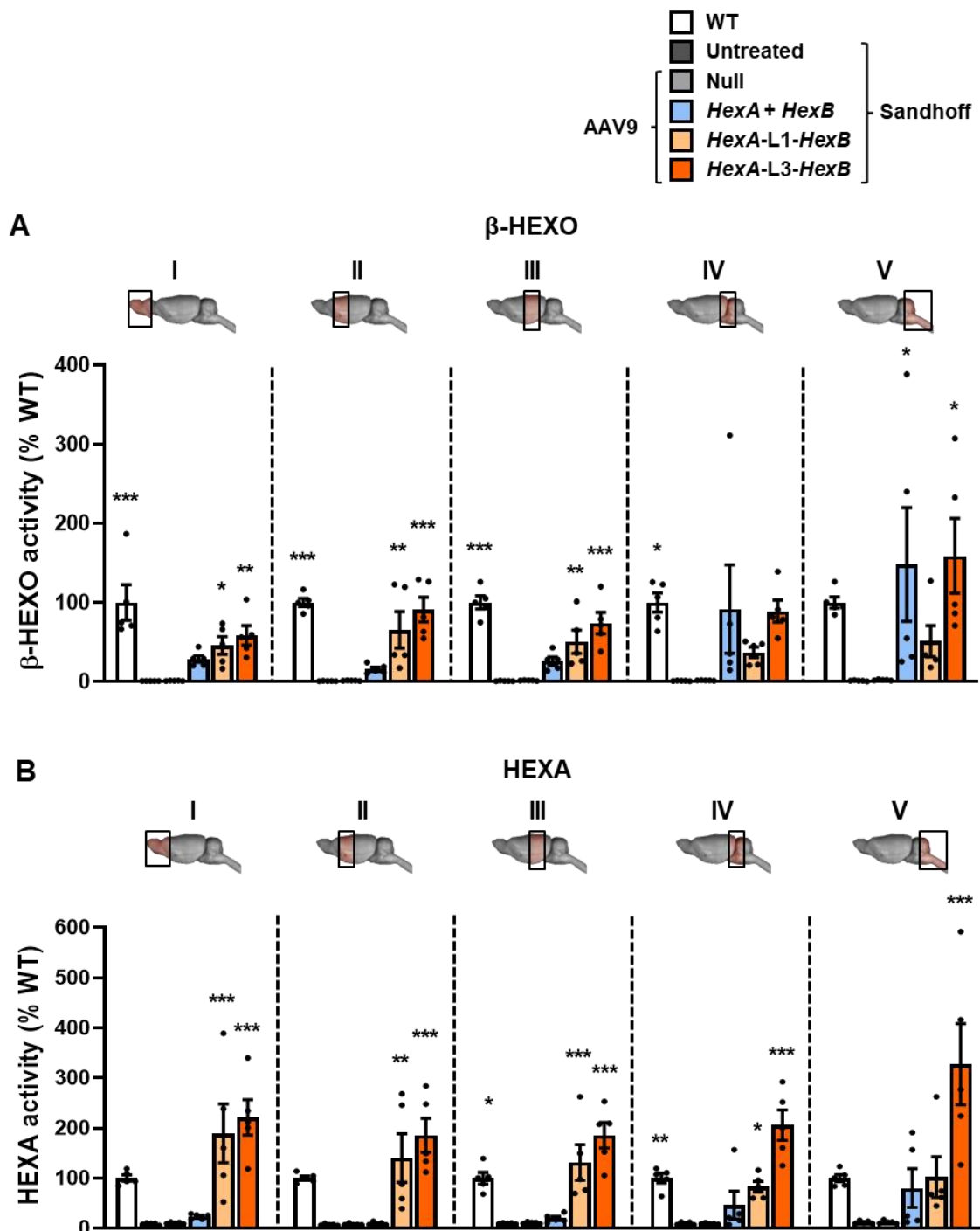


Figura 32. Activitat β -HEXO i HEXA a l'encèfal dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) a diferents regions de l'encèfal (I-V) de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

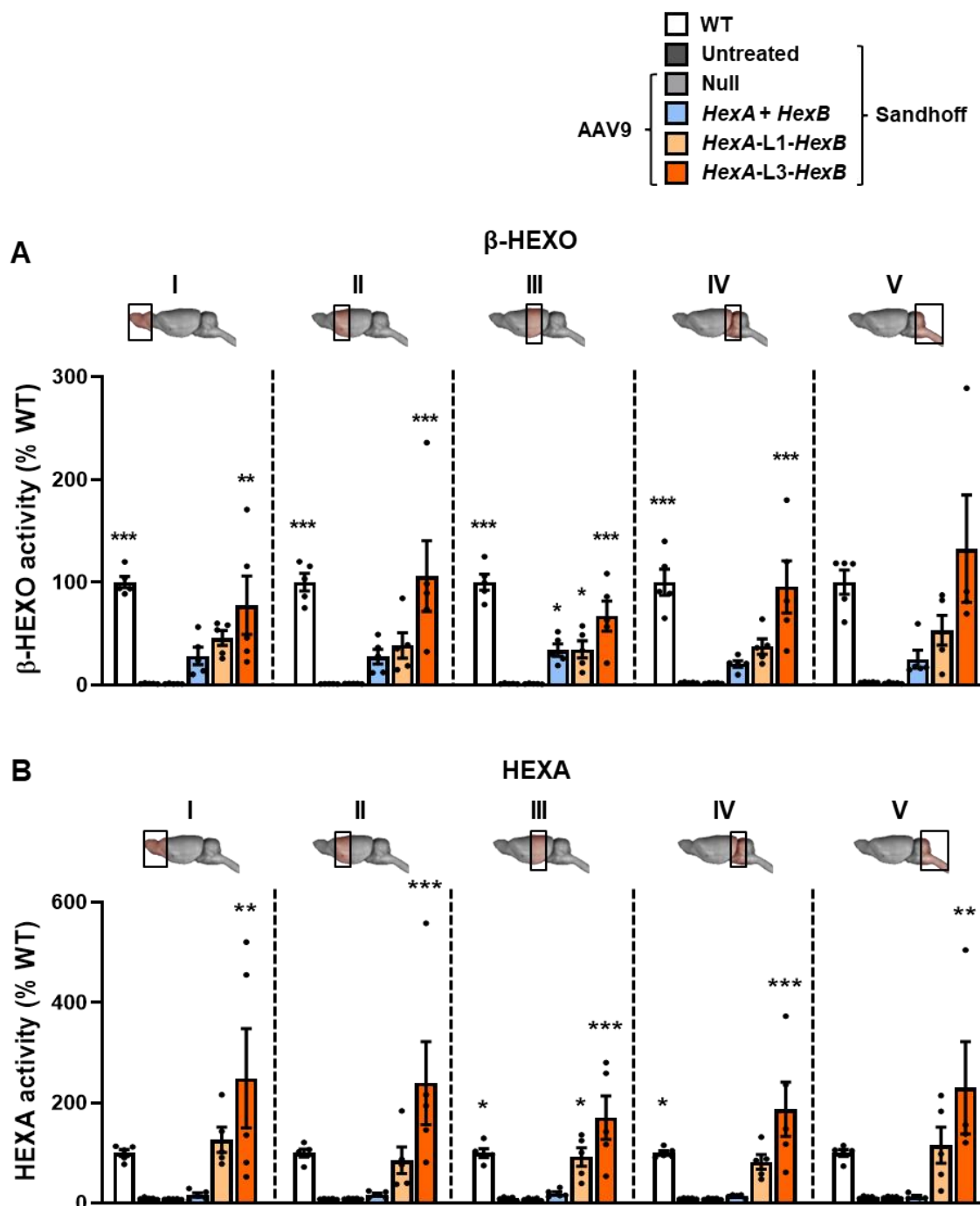


Figura 33. Activitat β -HEXO i HEXA a l'encèfal dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) a diferents regions de l'encèfal (I-V) de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

2.2. Correcció de l'acumulació primària del gangliòsid GM2

Tres mesos després del tractament, es va analitzar l'efecte de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals sobre l'acumulació del gangliòsid GM2 a l'encèfal dels ratolins Sandhoff mitjançant una anàlisi immunohistoquímica contra el GM2 en seccions de l'encèfal. Tal com s'havia observat a un mes d'edat, els ratolins Sandhoff no tractats o els injectats amb el vector *Null* d'ambdós sexes van presentar una evident acumulació del gangliòsid GM2 que era molt marcada a totes les regions de l'encèfal analitzades (Figura 34 i 35). Per contra, els talls histològics de l'encèfal dels animals Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals van mostrar una reversió completa de l'acumulació del gangliòsid GM2, tant en mascles com en femelles, amb un aspecte molt similar al dels animals WT (Figura 34 i 35). En els ratolins administrats amb els vectors AAV9 individuals, es va observar una reducció molt marcada de l'acumulació del gangliòsid GM2 a totes les regions de l'encèfal, tot i que no va ser total, ja que algunes d'aquestes regions mostraven cèl·lules amb marcatge positiu per GM2 (Figura 34 i 35).

Per tant, aquests resultats van mostrar una excel·lent eficàcia terapèutica, per part dels dos vectors AAV9 duals administrats directament al LCR, en la reversió de l'acumulació primària del gangliòsid GM2 a tot l'encèfal dels ratolins Sandhoff tractats, en comparació amb la correcció parcial aconseguida després de l'administració dels dos vectors AAV9 individuals.

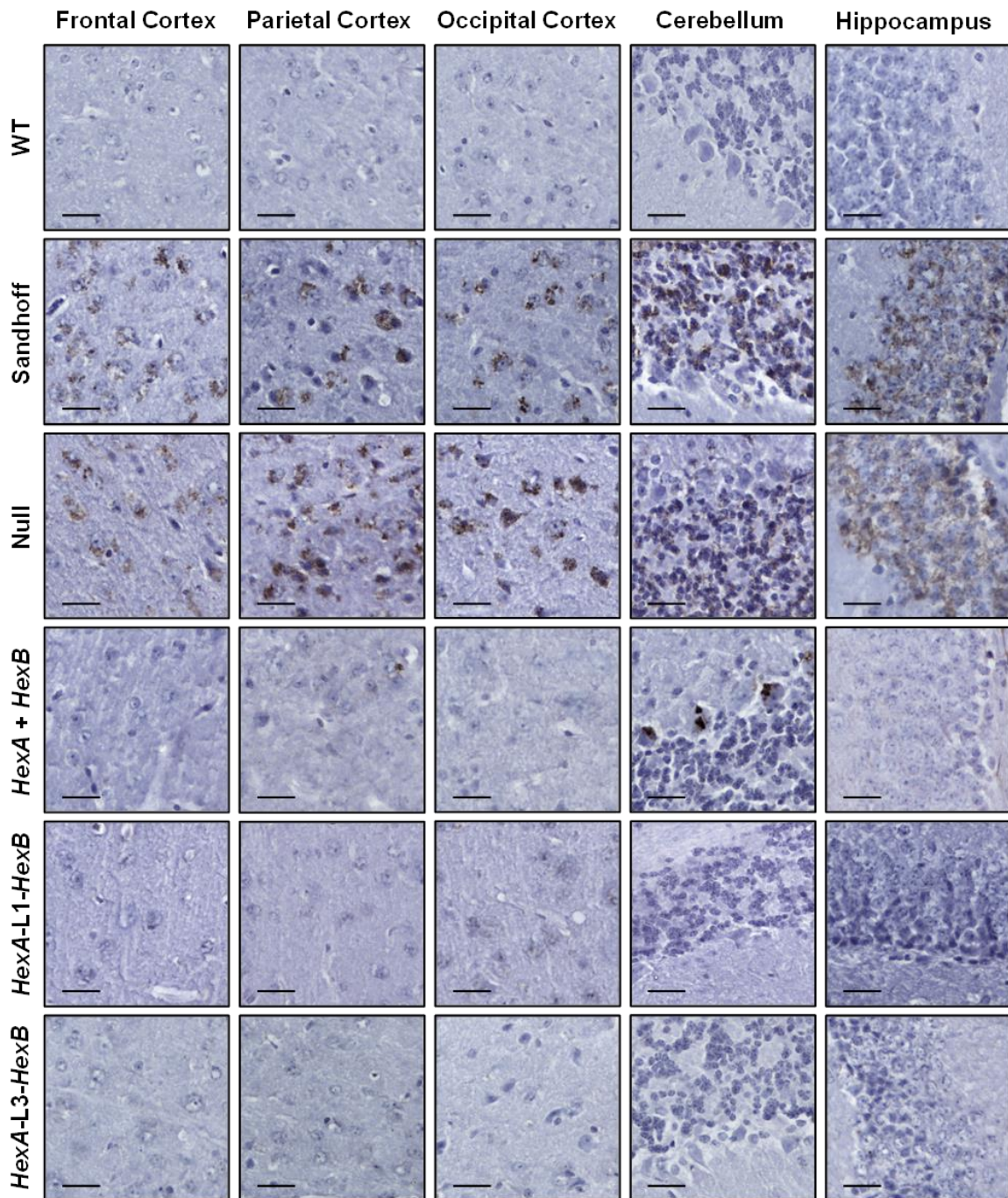


Figura 34. Normalització de l'acumulació del gangliòsid GM2 a l'encèfal dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. Estudi de l'acumulació del gangliòsid GM2, mitjançant la immunohistoquímica contra el GM2, a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 25 μ m.

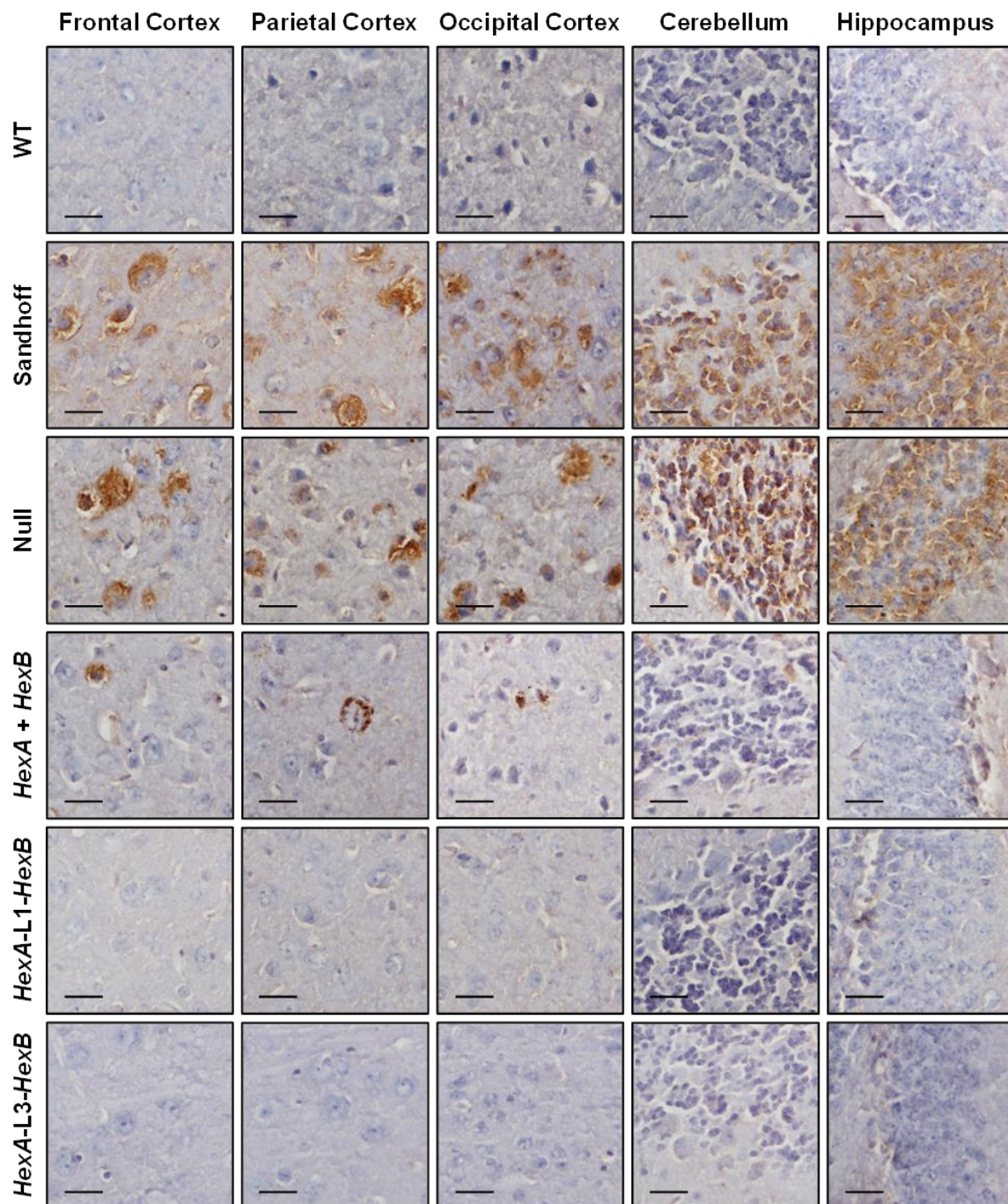


Figura 35. Normalització de l'acumulació del gangliòsid GM2 a l'encèfal dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. Estudi de l'acumulació del gangliòsid GM2, mitjançant la immunohistoquímica contra el GM2, a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 25 μ m.

2.3. Reducció de l'acumulació secundària del colesterol no esterificat

L'acumulació primària del gangliòsid GM2 als lisosomes també comporta altres acumulacions secundàries, com la del colesterol no esterificat, al model murí de la malaltia de Sandhoff. Així doncs, es va analitzar el contingut de colesterol no esterificat, mitjançant la tinció de filipina a seccions de l'encèfal dels ratolins Sandhoff 3 mesos després de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9. Mentre els animals Sandhoff no tractats i injectats amb el vector AAV9 *Null* tenien una gran acumulació de colesterol no esterificat a totes les regions analitzades, els tractaments amb els AAV9 duals van aconseguir una correcció a tot el SNC del model murí de la malaltia de Sandhoff (Figura 36 i 37). Els ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 individuals presentaven una reversió de l'acumulació del colesterol no esterificat a totes les regions del còrtex i l'hipocamp, però es van detectar algunes cèl·lules positives amb la tinció de filipina al cerebel (Figura 36). En les femelles, es va observar una reversió completa de l'acumulació de colesterol no esterificat a totes les regions analitzades tant amb els vectors AAV9 duals com amb els AAV9 individuals (Figura 37).

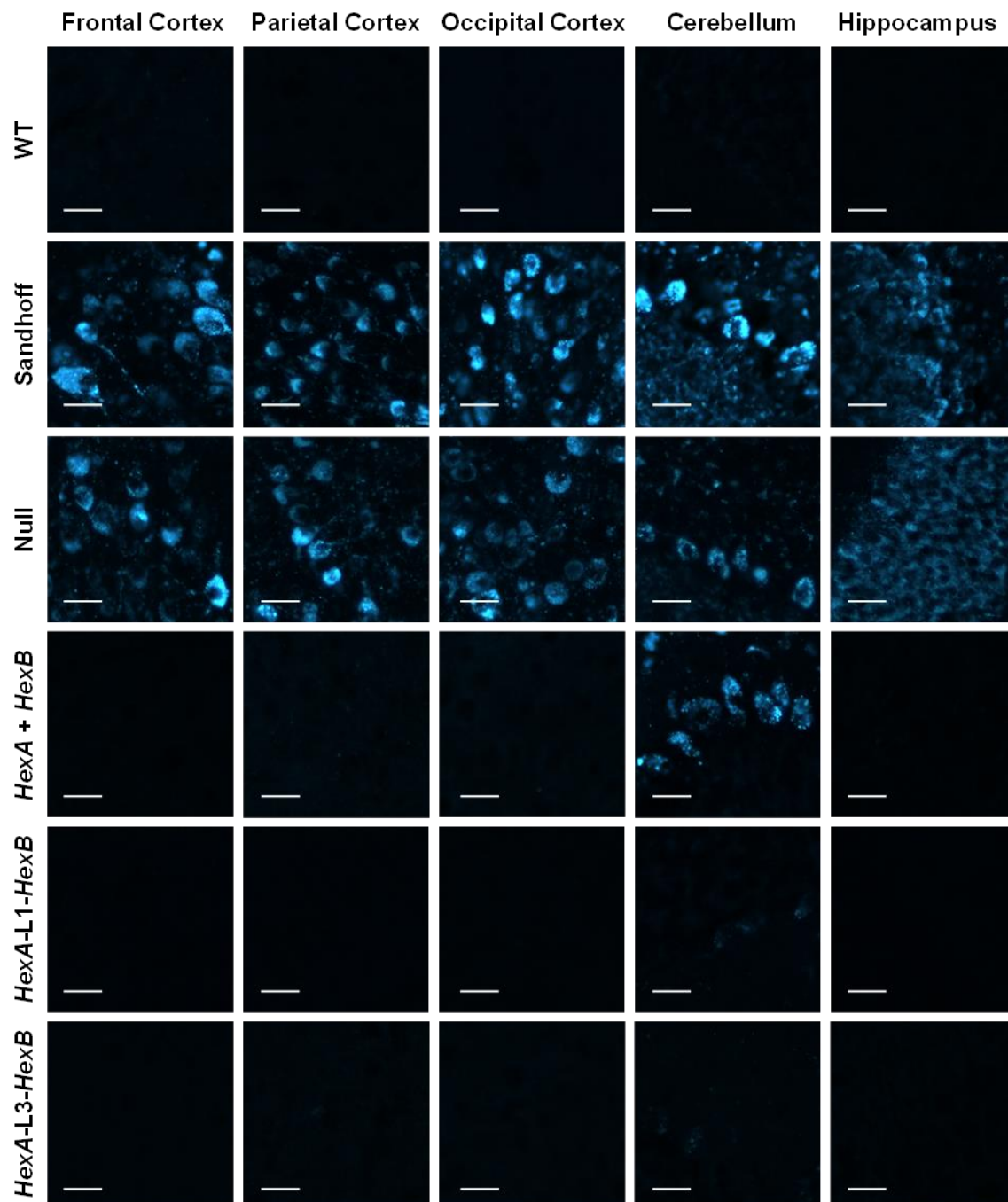


Figura 36. Correcció de l'acumulació del colesterol a l'encèfal dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. Estudi de l'acumulació del colesterol no esterificat mitjançant la tinció de filipina a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Imatges representatives de 3 animals per grup. Barra d'escala: 25 μ m.

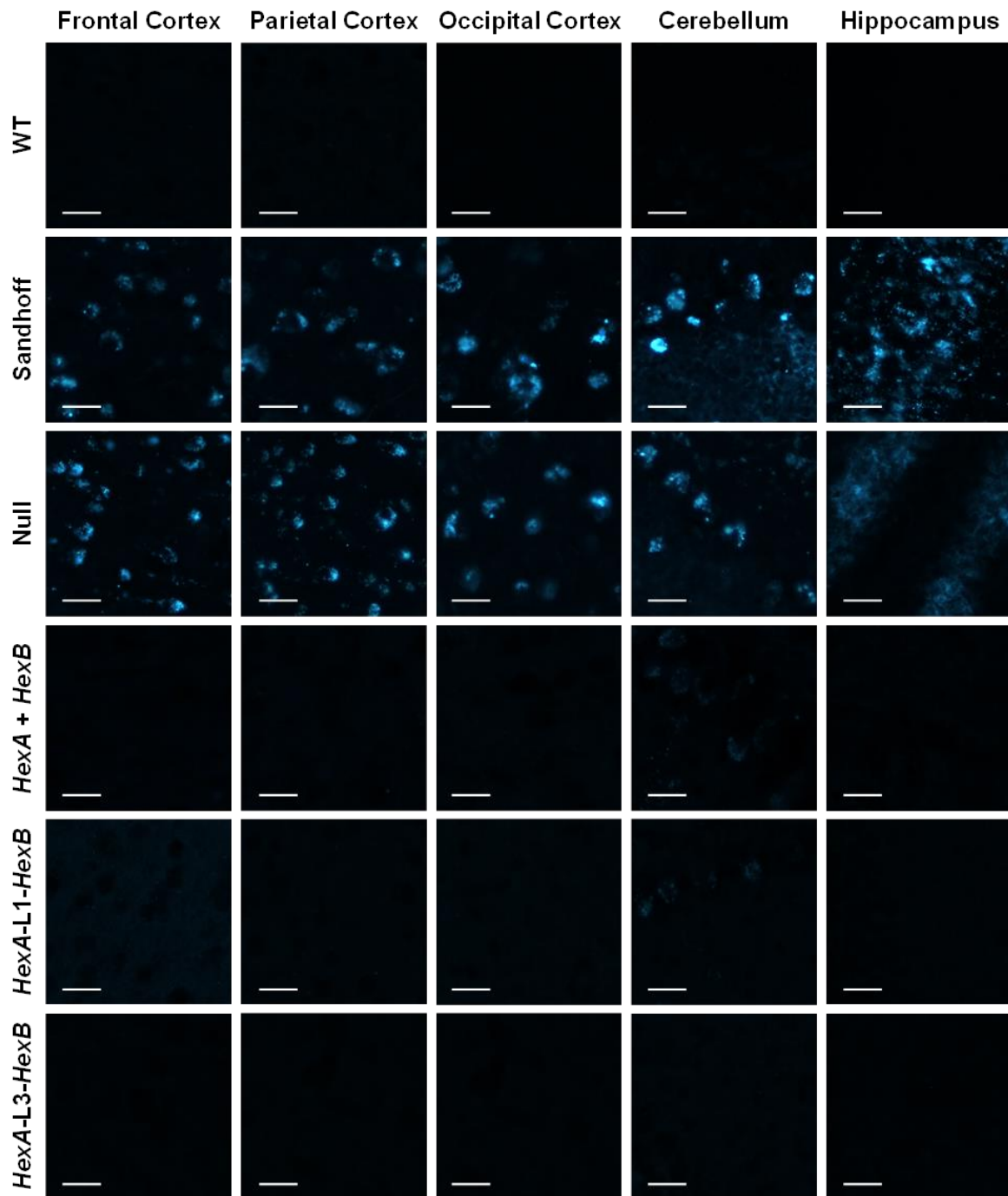


Figura 37. Correcció de l'acumulació del colesterol a l'encèfal dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. Estudi de l'acumulació del colesterol no esterificat mitjançant la tinció de filipina a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Imatges representatives de 3 animals per grup. Barra d'escala: 25 μ m.

2.4. Recuperació de l'homeòstasi lisosòmica en els animals tractats

2.4.1. Reversió de la distensió lisosòmica

L'acumulació primària del gangliòsid GM2 i les secundàries, com la del colesterol, provoquen un augment del número i/o la mida dels lisosomes. Després de l'administració dels vectors AAV9 duals, es va analitzar la distensió lisosòmica, en diferents seccions de l'encèfal, tant als ratolins Sandhoff tractats com també als animals WT i els Sandhoff no tractats, mitjançant una anàlisi immunohistoquímica contra el marcador lisosòmic LIMP2.

Tal com s'observa a les imatges del còrtex parietal, els ratolins Sandhoff no tractats o injectats amb el vector *Null* presentaven un gran augment del marcatge positiu de LIMP2, en comparació amb els animals WT, evidenciant la presència de la distensió lisosòmica al model murí de la malaltia de Sandhoff als 4 mesos d'edat (Figura 38A i 39A). Tant el tractament amb els vectors AAV9 duals com amb els vectors individuals va resultar en una normalització de la senyal positiva de LIMP2 a totes les regions analitzades de l'encèfal dels ratolins mascles i femelles Sandhoff, amb un nivell de marcatge similar al dels animals WT (Figura 38 i 39).

Per tant, la correcció de l'acumulació primària del gangliòsid GM2 i secundària del colesterol no esterificat al SNC va permetre la reducció de la mida i/o número dels lisosomes als ratolins Sandhoff tractats. Aquests resultats, en conjunt, van evidenciar la reversió completa de la distensió lisosòmica, observada ja al model murí de la malaltia de Sandhoff a un mes d'edat i més marcada als 4 mesos, independentment del vector duals utilitzat i assolint el mateix grau de correcció que amb els vectors AAV9 individuals.

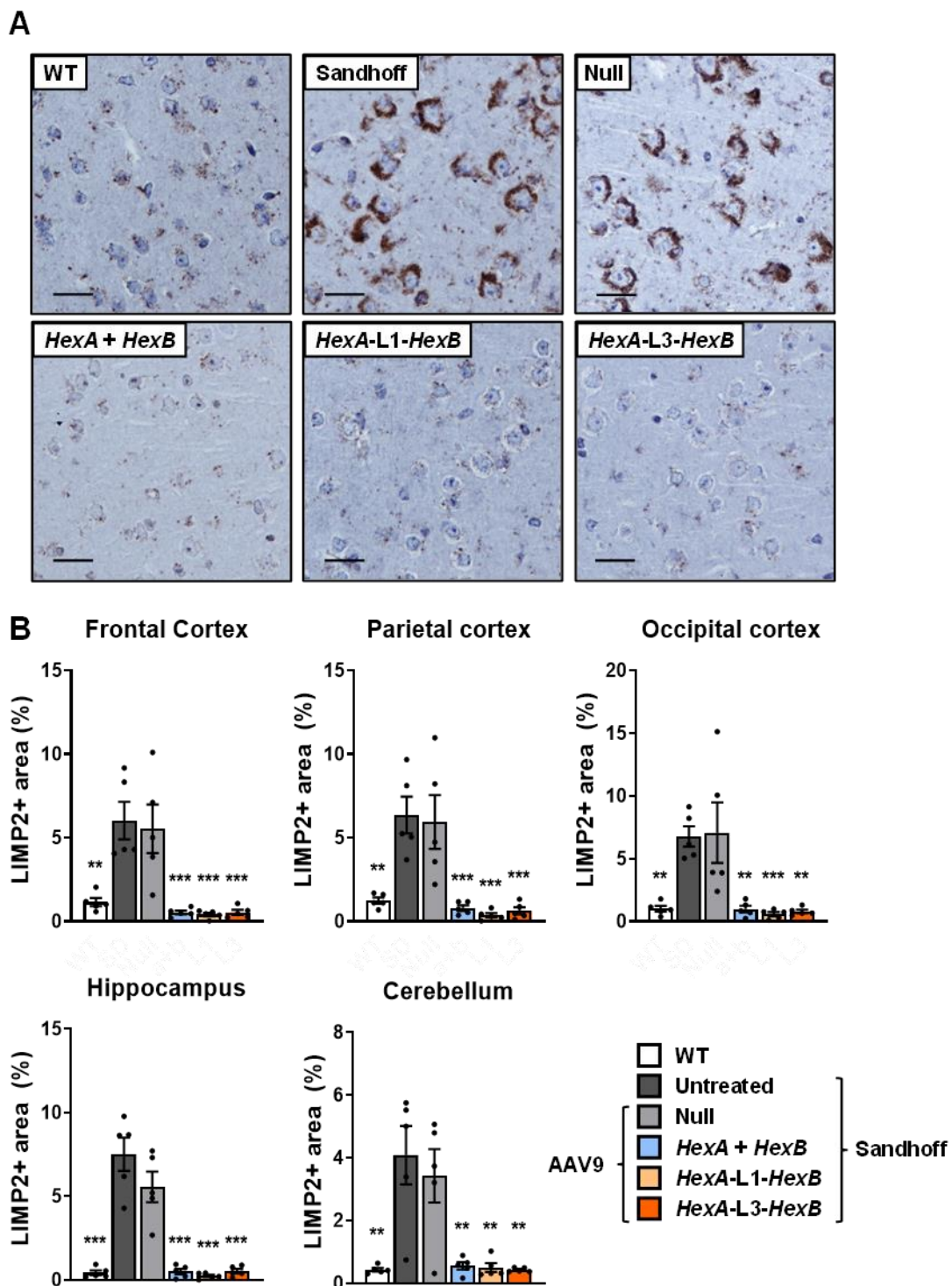


Figura 38. Normalització de la distensió lisosòmica a l'encèfal dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Avaluació de la distensió lisosòmica mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna LIMP2 a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. **(A)** Imatges representatives de l'anàlisi immunohistoquímica de seccions del còrtex parietal. Barra d'escala: 25 μ m. **(B)** Quantificació del percentatge d'àrea positiva de LIMP2. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

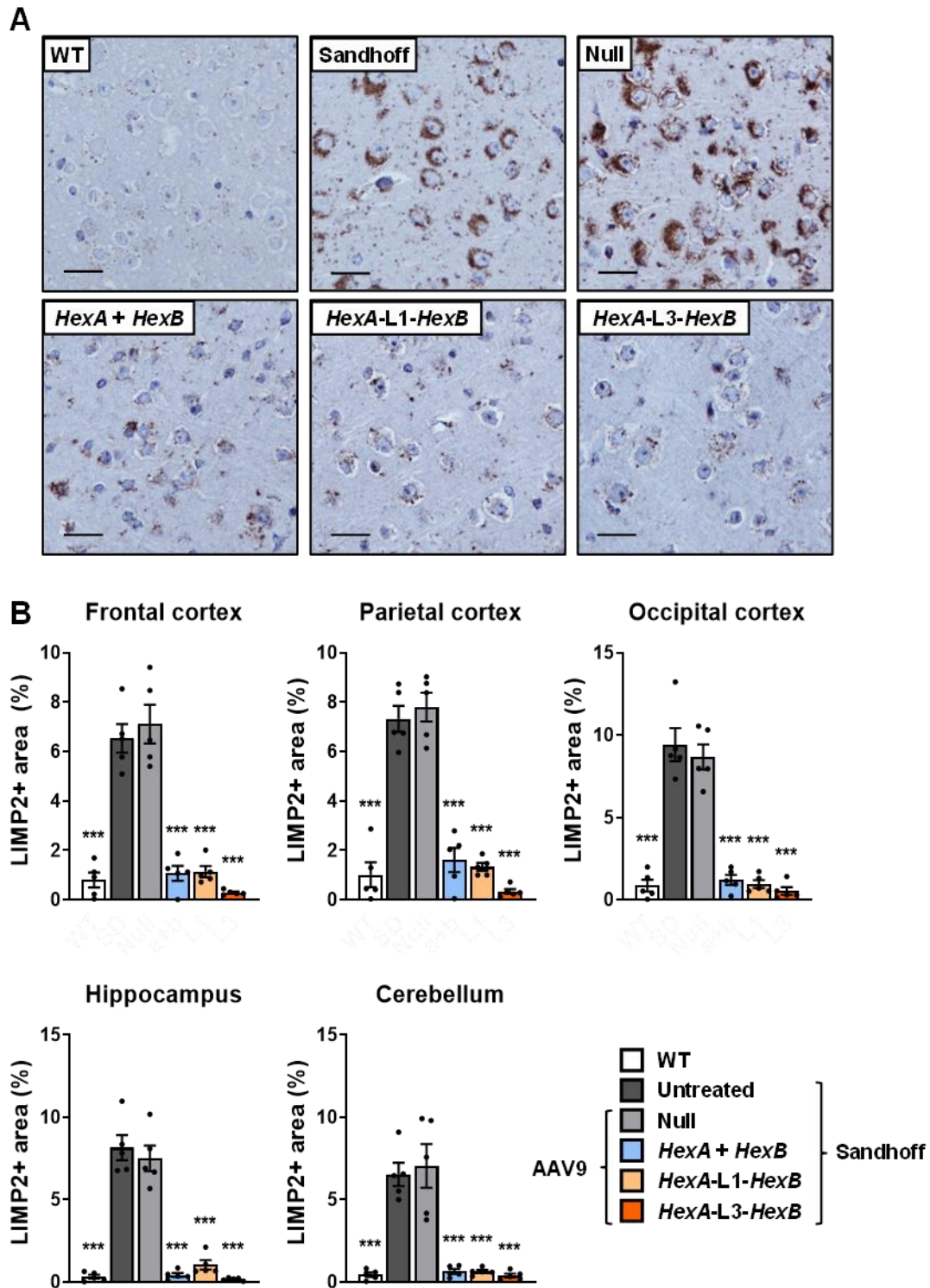


Figura 39. Normalització de la distensió lisosòmica a l'encèfal dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. **(A, B)** Avaluació de la distensió lisosòmica mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna LIMP2 a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. **(A)** Imatges representatives de l'anàlisi immunohistoquímica de seccions del còrtex parietal. Barra d'escala: 25 μ m. **(B)** Quantificació del percentatge d'àrea positiva de LIMP2. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

2.4.2. Normalització de l'homeòstasi del lisosoma

A continuació, es va estudiar l'efecte del tractament en l'homeòstasi del lisosoma mitjançant la determinació de l'activitat d'enzims lisosòmics, que ja estaven alterats als ratolins Sandhoff a un més d'edat, com era la GALNS, la GUSB, l'HGSNAT, la NAGLU i la SGSH als extractes proteics dels animals WT, Sandhoff no tractats i injectats amb els vectors AAV9 *Null*, els AAV9 individuals o bé els AAV9 duals. Als 4 mesos d'edat, l'encèfal dels ratolins mascles i femelles Sandhoff no tractats i injectats amb el vector AAV9 *Null* presentava un augment significatiu de l'activitat de la GALNS, la GUSB, la NAGLU i la SGSH, en comparació als ratolins WT, mentre que l'activitat HGSNAT disminuïa (Figura 40). L'activitat dels enzims lisosòmics analitzada als ratolins mascles Sandhoff tractats, tant amb els vectors AAV9 duals com amb els AAV9 individuals va retornar als nivells dels animals WT, tant en mascles com en femelles (Figura 40).

Per tant, aquests resultats, juntament amb la normalització de la distensió lisosòmica, van demostrar que, tres mesos després del tractament amb els vectors AAV9 duals o els AAV9 individuals, va permetre recuperar completament l'homeòstasi lisosòmica al model murí de la malaltia de Sandhoff.

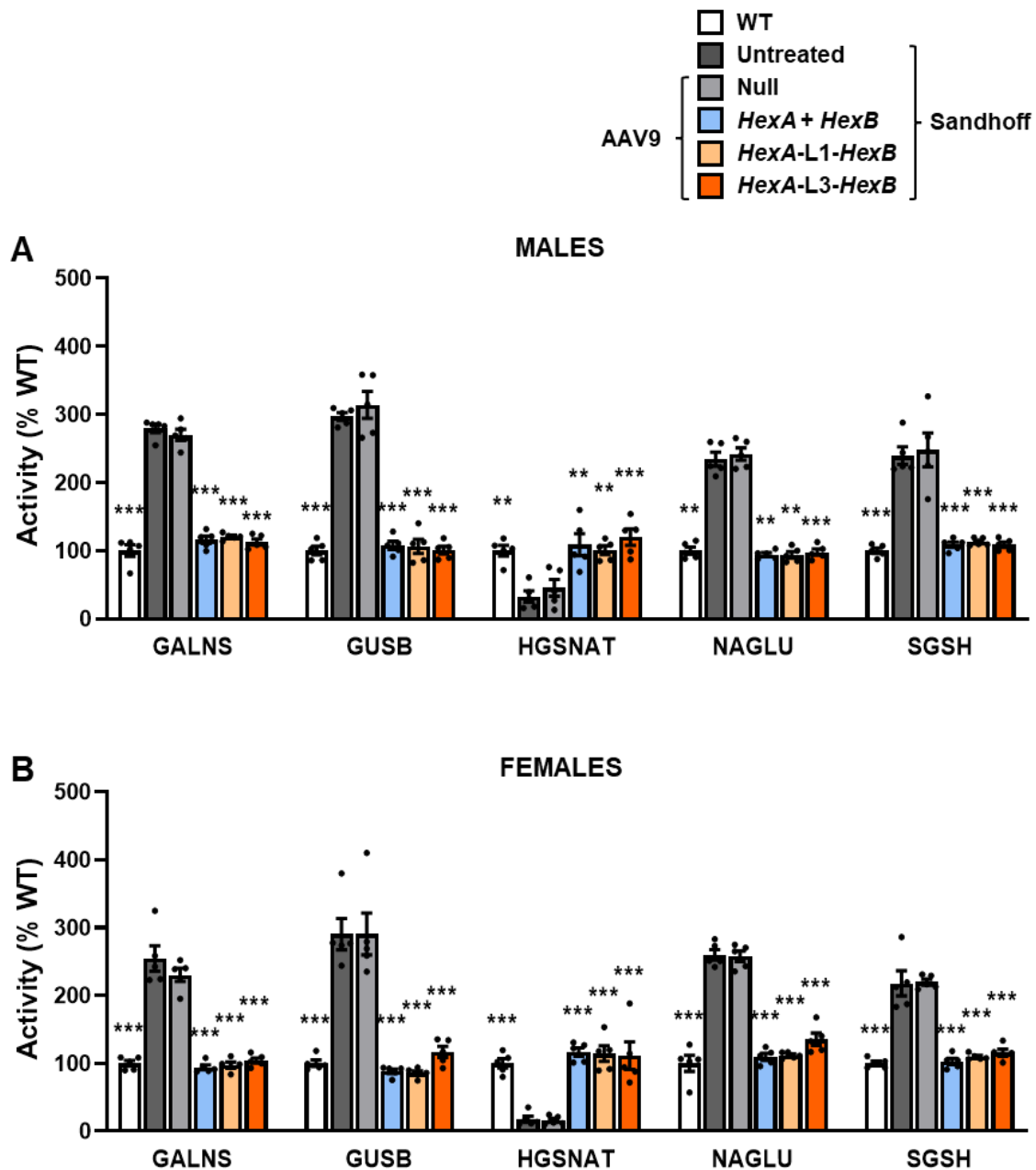


Figura 40. Recuperació de l'homeòstasi del lisosoma a l'encèfal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat dels enzims lisosòmics GALNS, GUSB, HGSNAT, NAGLU i SGSH als extractes proteics de l'encèfal de ratolins mascles **(A)** i femelles **(B)** dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* dosi 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null*: dosi 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

2.4.3. Anàlisi de l'autofàgia

El lisosoma té un paper molt important en les vies de degradació cel·lular com l'autofàgia, que és un procés vital pel manteniment de l'energia i l'homeòstasi dels teixits, tot degradant els components intracel·lulars danyats o en excés com ara proteïnes, lípids i orgànuls, o bé reciclant els productes de degradació (Ballabio, 2009). La disfunció de les capacitats hidrolítiques dels lisosomes perjudica directament al flux autofàgic, per aquesta raó, les alteracions en el procés d'autofàgia és un mecanisme comú en moltes LSDs (Seranova, 2017).

Per tal d'analitzar els problemes d'autofàgia al model murí de la malaltia de Sandhoff i l'efecte del tractament amb els vectors AAV9 duals, es va quantificar la cadena lleugera 3B de la proteïna associada als microtúbuls 1A/1B (*microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B*, LC3B) mitjançant *Western blot*. Durant la formació de les membranes dels fagosomes, la LC3B, en la seva forma citosòlica (LC3B-I), es conjuga amb la fosfatidiletanolamina per formar la LC3B-II, que formarà part de les membranes dels fagosomes. Per l'avaluació del flux autofàgic, es va quantificar la ràtio entre LC3B-II/LC3B-I, ja que un augment en la formació dels fagosomes es traduirà en un augment de la LC3B-II (Tanida, 2008).

Per tant, es van analitzar les proteïnes LC3B-I i la LC3B-II per *Western blot* (Figura 41A) i, seguidament, es va calcular la ràtio LC3B-II/ LC3B-I al cervell dels ratolins dels diferents grups experimentals als 4 mesos d'edat (Figura 41B). En els animals Sandhoff no tractats i injectats amb els AAV9 *Null*, es va observar un increment de la proteïna LC3B-II, en comparació amb la senyal detectada als animals WT que, conseqüentment, va provocar un augment de la ràtio LC3B-II/ LC3B-I, indicant una alteració del flux autofàgic a l'encèfal del model murí de la malaltia de Sandhoff (Figura 41). Aquesta alteració es va reduir significativament fins a als nivells dels animals WT, tres mesos després del tractament, amb els vectors AAV9 duals i els AAV9 individuals (Figura 41).

Per tant, independentment dels vectors AAV9 utilitzats, l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 que codificaven pels gens *HexA* i/o *HexB* al model murí de la malaltia de Sandhoff va conduir a una recuperació del flux autofàgic.

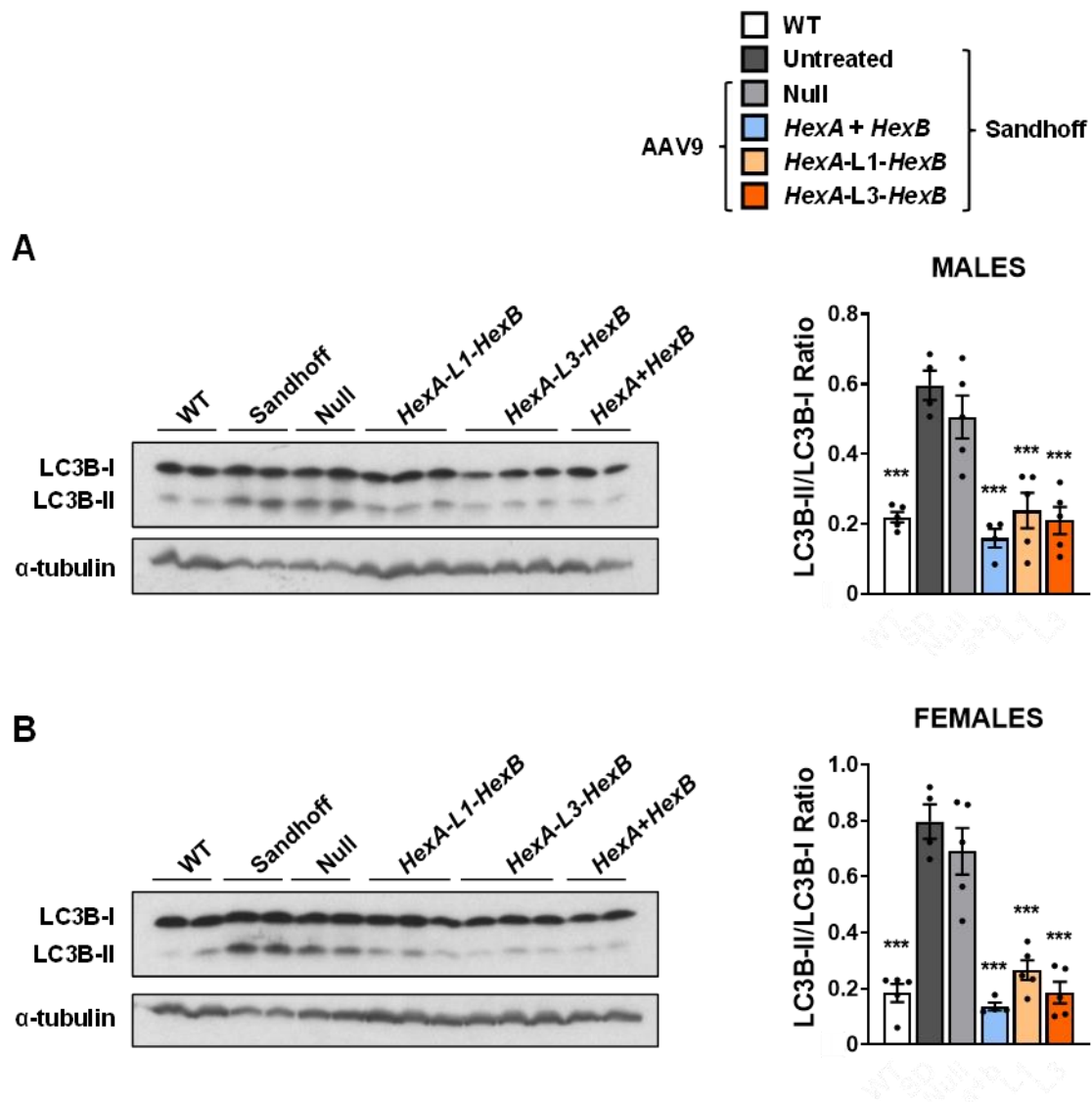


Figura 41. Recuperació del flux autofàgic a l'encèfal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Avaluació del procés d'autofàgia a l'encèfal de ratolins mascles (A) i femelles (B) dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Imatge representativa de la membrana de Western blot per a la determinació de la quantitat de la proteïna LC3B-I i LC3B-II i l' α -tubulina, utilitzada com a control de càrrega, juntament amb la quantificació de la ràtio LC3B-II/ LC3B-I de dues membranes de Western blot. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. * $p < 0.001$ vs. *Null*.**

2.5. Correcció de la neuroinflamació

L'acumulació del gangliòsid GM2 i altres molècules secundàries no degradades als lisosomes del SNC causa una severa neurodegeneració i una disminució progressiva de la funció neurològica (Wada, 2000). En general, els mecanismes patològics de la neurodegeneració a la malaltia de Sandhoff són poc coneguts (Ogawa, 2017). Diferents estudis han demostrat que les respostes inflamatòries desencadenades al SNC dels

ratolins Sandhoff causen danys neuronals i indueixen l'apoptosi neuronal a través de l'expressió de factors inflamatoris (Wada, 2000). La micròglia, en condicions normals, té un paper important en la supervivència i la neurogènesi de les neurones alliberant factors neurotròpics i antiinflamatoris. En canvi, en processos patològics es produeix una activació de la micròglia, anomenada microgliosi, i que allibera factors pro-inflamatoris com el TNF- α o d'altres citocines inflamatòries (Wada, 2000, 2001). Aquestes citocines alliberades tenen un paper rellevant en la conversió dels astròcits cap a un estat reactiu, un procés anomenat astrocitosi (Ogawa, 2017). Els astròcits, una vegada s'activen, també participen en la regulació de les respostes inflamatòries mitjançant l'alliberament de factors neurotòxics i pro-inflamatoris (Ogawa, 2017). Per tant, la micròglia activada i l'astrocitosi són components clau de les respostes immunitàries del SNC, i tenen un paper important en la progressió i la gravetat dels trastorns neurològics (Ogawa, 2017; Wada, 2000, 2001).

Per determinar l'efecte del tractament amb els diferents vectors AAV9 duals en la neuroinflamació, en primer lloc, es va estudiar l'activació de la micròglia mitjançant la quantificació de l'expressió gènica per qPCR del clúster de diferenciació 68 (*cluster of differentiation 68*, CD68) a dues zones de l'encèfal, una més frontal (Figura 42A) i una altra més caudal (Figura 42B), dels diferents grups experimentals als 4 mesos d'edat. El CD68 és un marcador molt comú de les cèl·lules del llinatge dels macròfags que es localitza principalment a la micròglia activada i no activada, tot i que a la micròglia activada es troba en majors quantitats (Walker, 2015). Es va detectar un increment de la micròglia activada en ambdues regions de l'encèfal dels ratolins Sandhoff no tractats o injectats amb el vector AAV9 *Null*, que es va normalitzar després de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals i els AAV9 individuals als ratolins Sandhoff (Figura 42).

En concret, la correcció de la microgliosi va assolir uns nivells similars als dels animals WT, tant a la regió més frontal on la inflamació era més moderada, com a la regió més caudal on els nivells de micròglia activada eren més exacerbats (Figura 42). Per tant, l'aproximació terapèutica basada en l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals als ratolins Sandhoff va conduir a una normalització de la microgliosi, observada al model murí de la malaltia de Sandhoff.

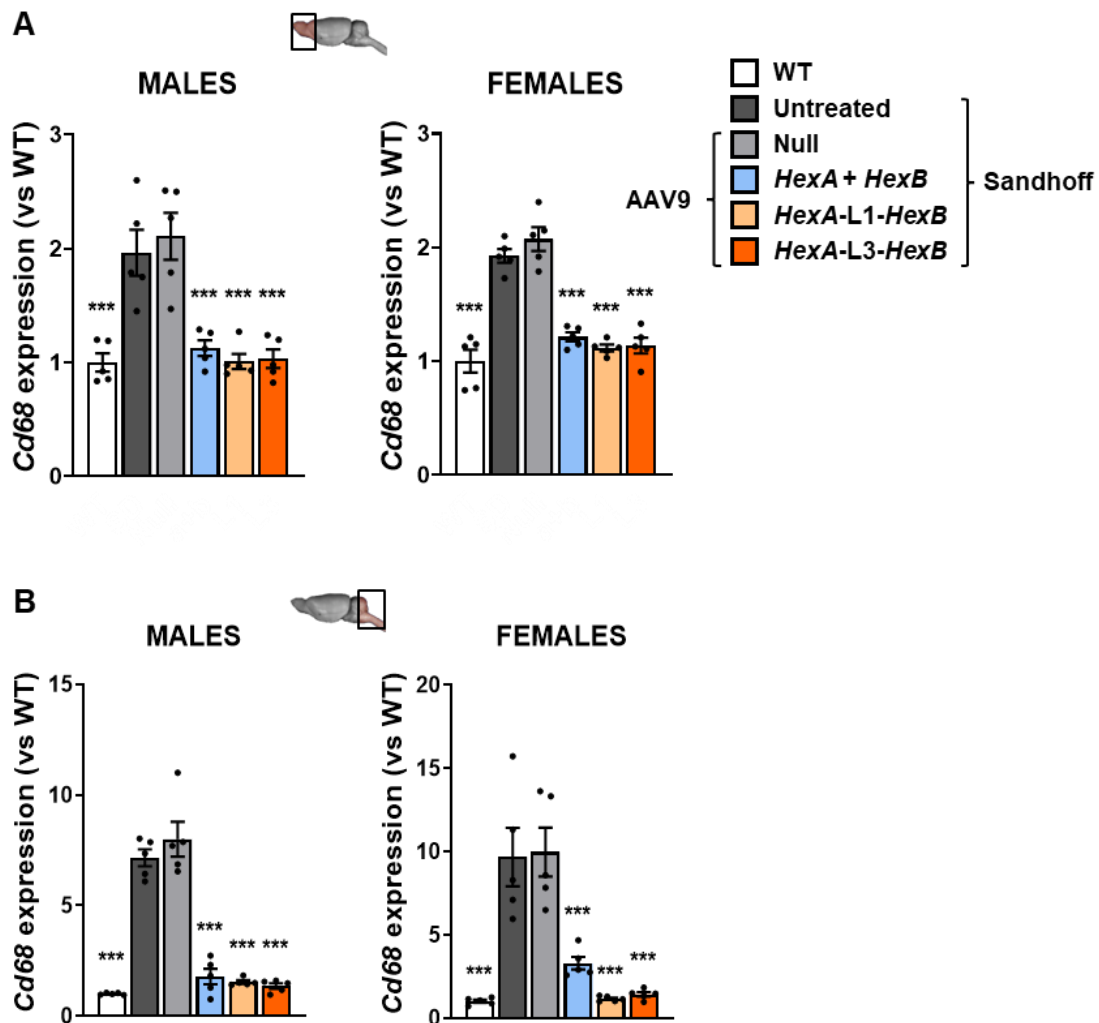


Figura 42. Correcció de la microgliosi a l'encèfal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Quantificació dels nivells d'expressió del gen CD68 per qPCR a la regió més frontal (A) i més caudal (B) de l'encèfal de ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

També es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica contra la GFAP, un marcador d'astròcits activats, per tal d'avaluar l'efecte del tractament amb els vectors AAV9 duals a l'astrocitosi. Tres mesos després de l'administració dels vectors intra-LCR, es va observar una reducció dràstica i estadísticament significativa del marcatge positiu per GFAP a totes les regions de l'encèfal analitzades, independentment del vector AAV9 utilitzat (duals o individuals) en comparació als animals Sandhoff administrats amb els vectors *Null*, (Figura 43 i 44). Tal com s'observa a les imatges del còrtex parietal, els astròcits reactius detectats als ratolins Sandhoff no tractats o injectats amb el vector *Null* van desaparèixer completament després del tractament, tant en mascles (Figura 43) com en femelles (Figura 44), de manera similar als animals WT.

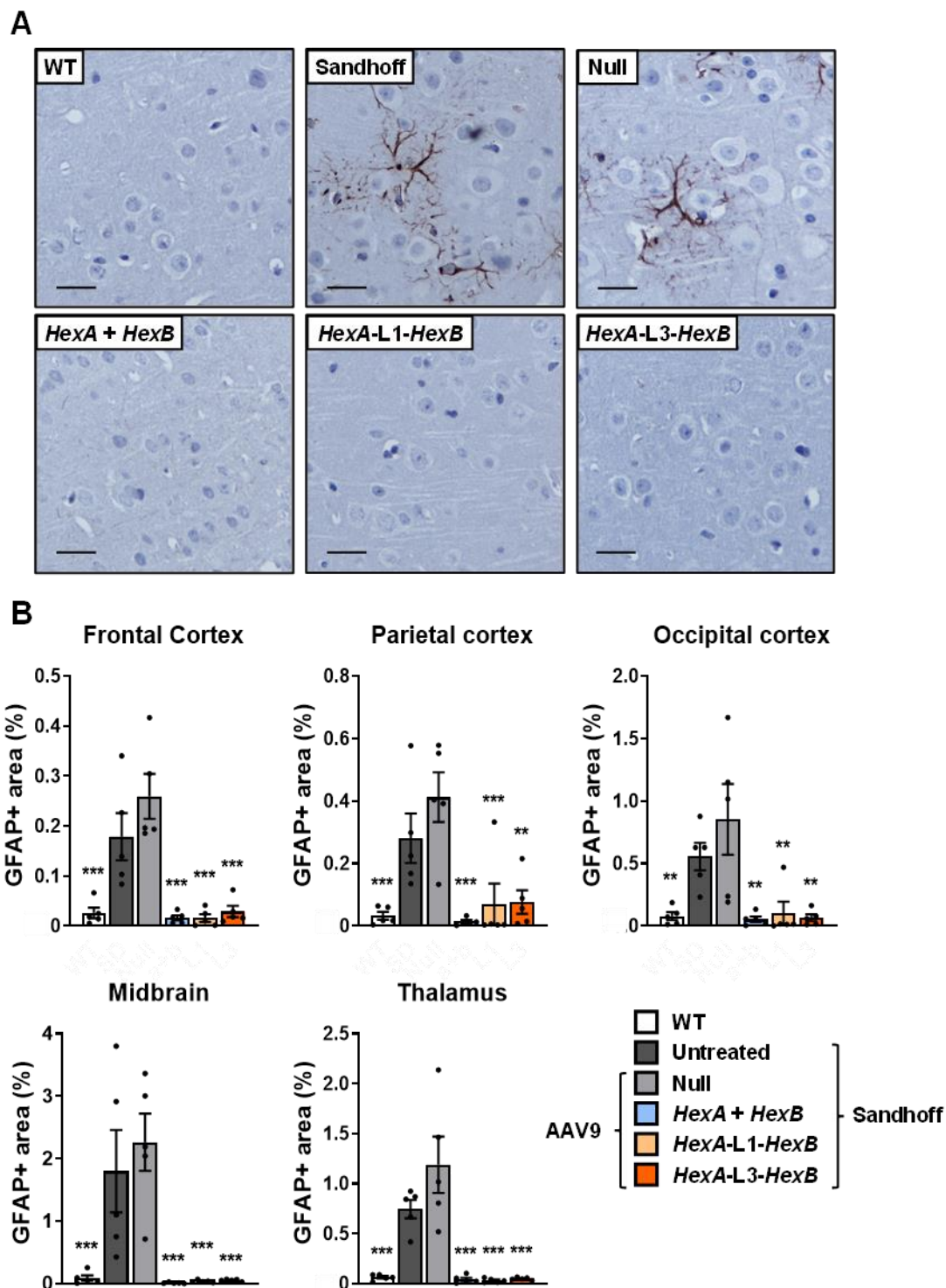


Figura 43. Reversió de l'astrocitosi a l'encèfal dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Avaluació de l'astrocitosi mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra el GFAP a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. (A) Imatges representatives de l'anàlisi immunohistoquímica de seccions del còrtex parietal. Barra d'escala: 25 μ m. (B) Quantificació del percentatge d'àrea positiva de GFAP. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. ** $p < 0.01$ i * $p < 0.001$ vs. *Null*.**

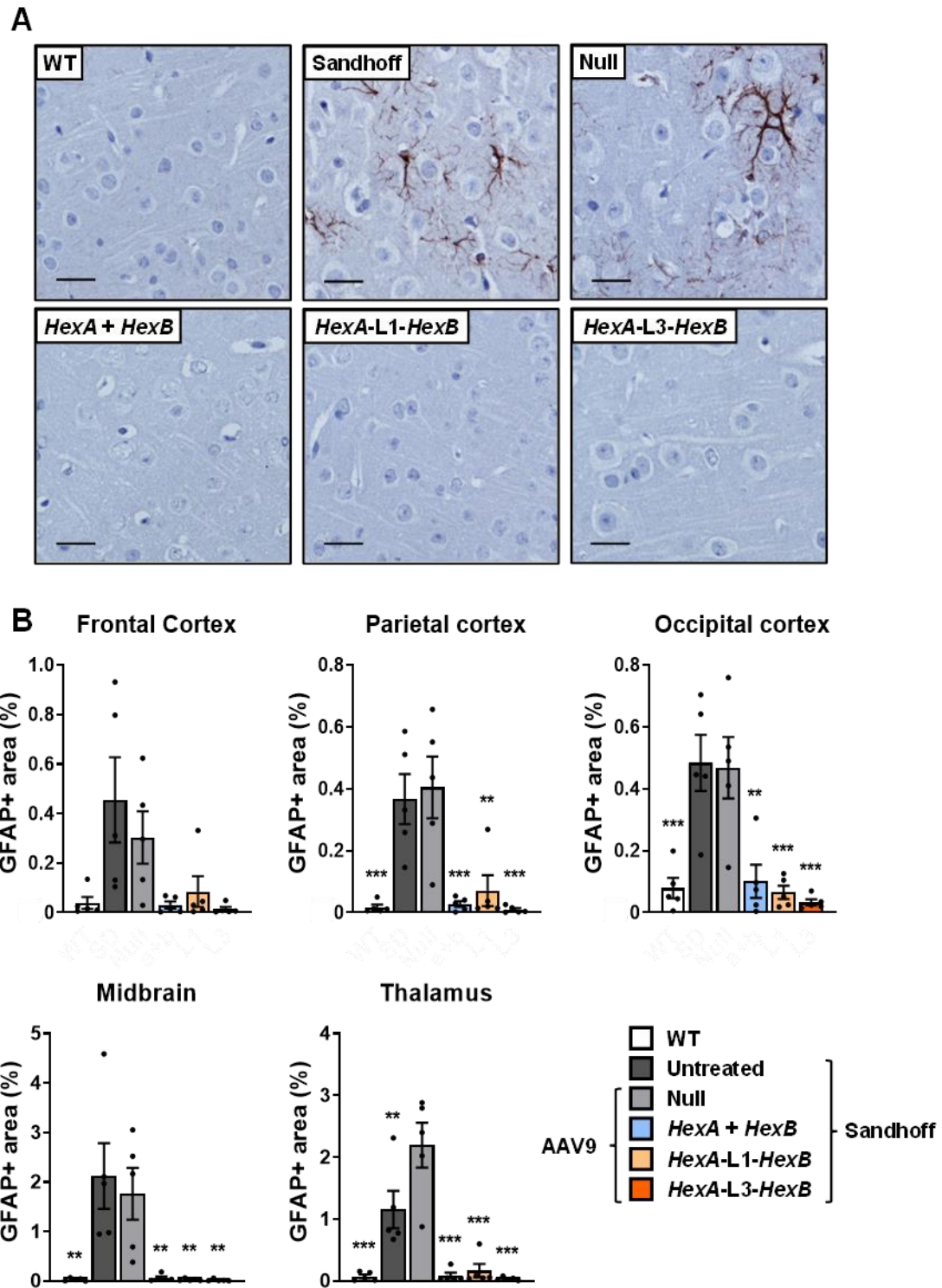


Figura 44. Reversió de l'astrocitosi a l'encèfal dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Avaluació de l'astrocitosi mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra el GFAP a diferents regions de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. (A) Imatges representatives de de l'anàlisi immunohistoquímica de seccions del còrtex parietal. Barra d'escala: 25 μ m. (B) Quantificació del percentatge d'àrea positiva de GFAP. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. ** $p < 0.01$ i * $p < 0.001$ vs. *Null*.**

Així doncs, després d'observar l'activació de la micròglia i l'astrocitosi al model murí de la malaltia de Sandhoff, es va analitzar els nivells d'expressió gènica de diferents citocines alterades involucrades en el procés inflamatori com *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl10*, *Mcp1*, *Tgf1 β* , *Tnfa* per qPCR a dues regions de l'encèfal, una més propera al punt d'injecció (Figura 45A i 46A) i l'altra més distal (Figura 45B i 46B), en els diferents grups experimentals als 4 mesos d'edat. En els ratolins Sandhoff no tractats i els administrats amb el vector AAV9 *Null*, es va observar un augment significatiu dels nivells d'expressió de totes les citocines analitzades a les dues regions de l'encèfal, tant als mascles com a les femelles, en comparació amb els animals WT (Figura 45 i 46). Els animals tractats amb els vectors AAV9 duals o els individuals, l'alteració del perfil de citocines es va corregir a ambdues àrees de l'encèfal analitzades, assolint uns nivells similars als dels animals WT tant en mascles (Figura 45) com en femelles (Figura 46).

En conjunt, tots aquests resultats indicaven que l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de la malaltia de Sandhoff va resultar amb una correcció generalitzada de la neuroinflamació, tant de la microgliosi, l'astrocitosi com el perfil de citocines.

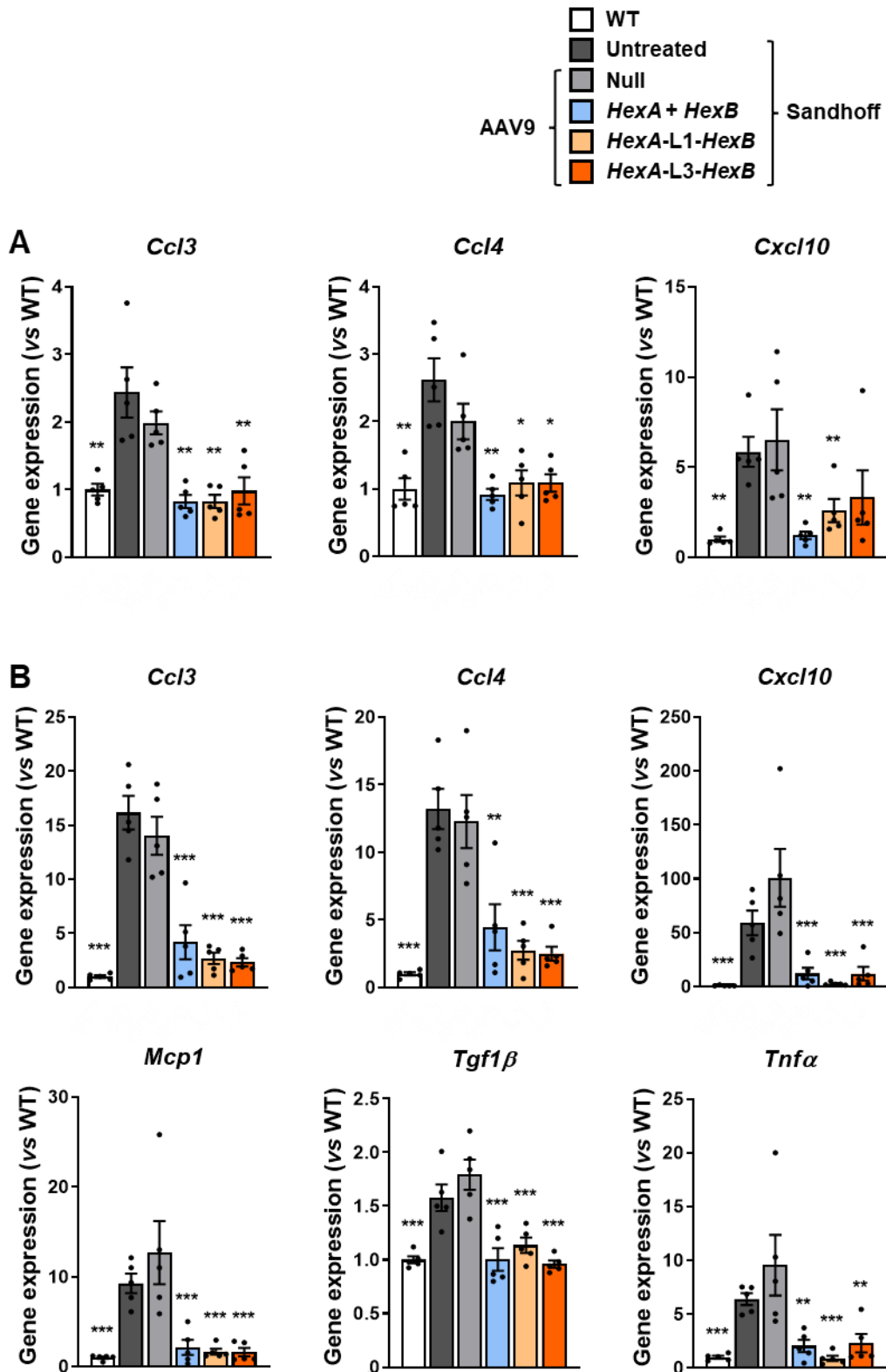


Figura 45. Normalització dels nivells de citocines a l'encèfal dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Anàlisi del perfil de citocines mitjançant l'expressió gènica per qPCR dels gens *Ccl3*, *Ccl4* i *Cxcl10* a la regió més frontal **(A)** i *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl10*, *Mcp1*, *Tgf1β* i *Tnfa* a la més caudal **(B)** de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

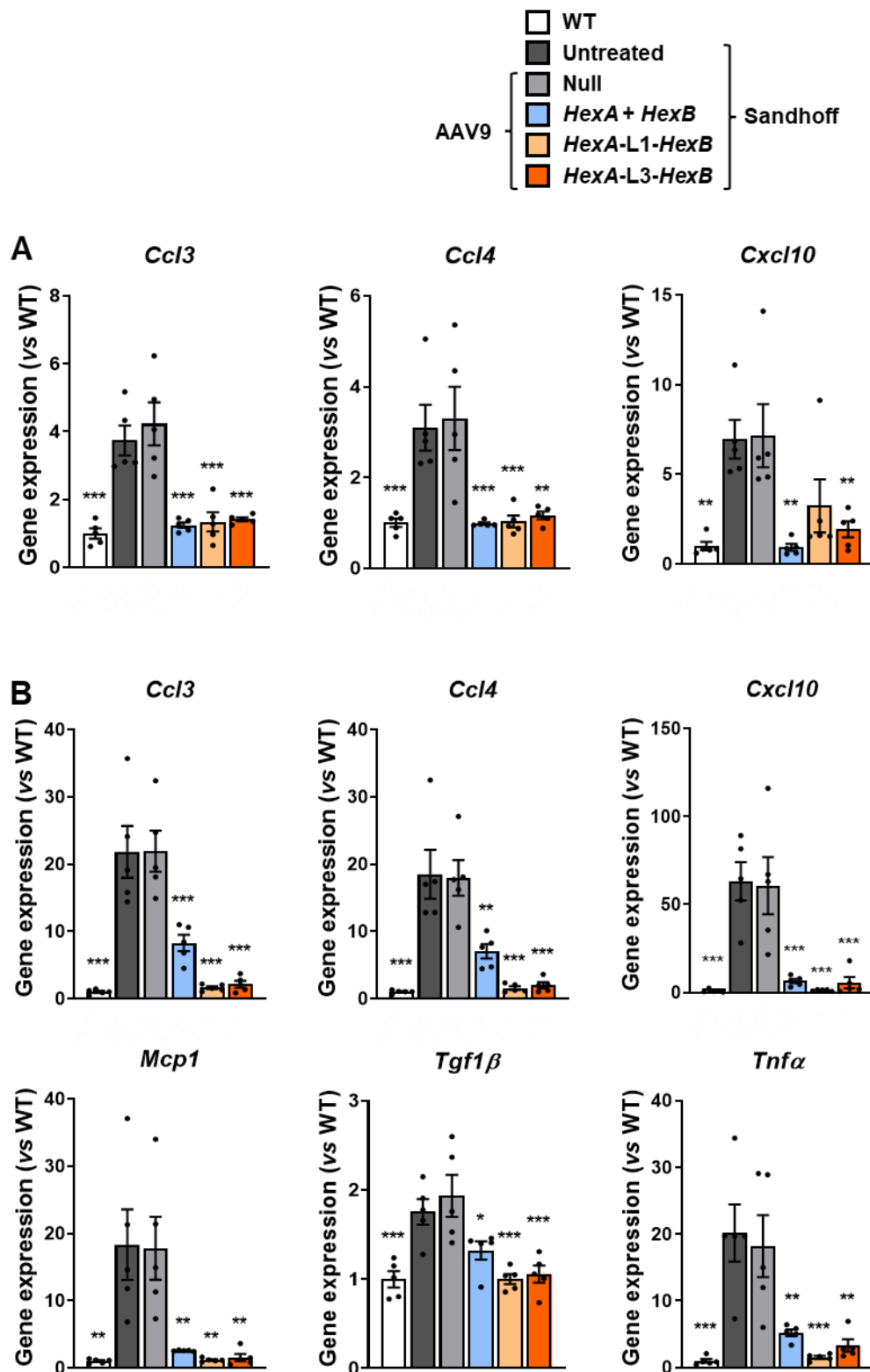


Figura 46. Normalització dels nivells de citocines a l'encèfal dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Anàlisi del perfil de citocines mitjançant l'expressió gènica per qPCR dels gens *Ccl3*, *Ccl4* i *Cxcl10* a la regió més frontal (A) i *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl10*, *Mcp1*, *Tgf1β*, *Tnfα* a la més caudal (B) de l'encèfal de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

2.6. Efecte del tractament amb els vectors AAV9 duals sobre la desmielinització

Moltes LSDs que acumulen glicoesfingolípidos tenen associats defectes en la mielinització (Baek, 2009). Per determinar l'efecte dels tractaments amb els vectors AAV9 duals en la mielinització, es van quantificar per qPCR els nivells d'expressió de dos gens codificants per components essencials de la mielina o de proteïnes que participen en el procés de mielinització al cervell (Figura 47A) i a dues regions de la medul·la espinal, una més cranial (Figura 47B) i una altra més caudal (Figura 47C) dels ratolins WT, Sandhoff no tractats i injectats amb els vectors AAV9 als 4 mesos d'edat. En concret, es va avaluar l'expressió de la proteolipina 1 (*proteolipid protein 1*, PLP1; Gen: *Plp1*), la proteïna estructural més abundant de la mielina que se sintetitza majoritàriament en els oligodendròcits (Greer, 2002; Werner, 2013); i la 2-hidroxiacilesfingosina 1- β -galactosiltransferasa (*2-hydroxyacylsphingosin 1-beta-galactosyltransferase*, GalCerS; Gen: *Ugt8*), un enzim clau per la síntesi dels lípids més abundants de la mielina, els sulfàtids, els quals tenen un paper important en el funcionament i l'estabilitat de la mielina (Yang, 2019).

En ambdós sexes, els ratolins Sandhoff no tractats i injectats amb el vector AAV9 *Null* van presentar una reducció significativa de l'expressió dels gens *Plp1* i *Ugt8* al cervell i a les dues regions de la medul·la espinal, en comparació als nivells detectats als animals WT (Figura 47). Pel que fa al tractament amb els vectors AAV9 duals o els AAV9 individuals, es va aconseguir una millora substancial de l'expressió del gen *Plp1* i una correcció estadísticament significativa del gen *Ugt8* al cervell dels ratolins Sandhoff tractats, en comparació als animals injectats amb els vectors *Null*, tant en mascles com en femelles (Figura 47A). De manera similar, a les dues regions analitzades de la medul·la espinal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals o individuals, es va observar un augment de l'expressió gènica de *Plp1* i *Ugt8*, en ambdós sexes, arribant en la majoria dels casos a uns nivells d'expressió similars als dels animals WT (Figura 47B i 47C). En general, els vectors AAV9 individuals van presentar una correcció lleugerament menor de l'expressió gènica tant de *Plp1* com *Ugt8* en comparació als vectors AAV9 duals (Figura 47B i 47C). Per tant, l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de la malaltia Sandhoff va permetre una normalització de la mielinització al SNC.

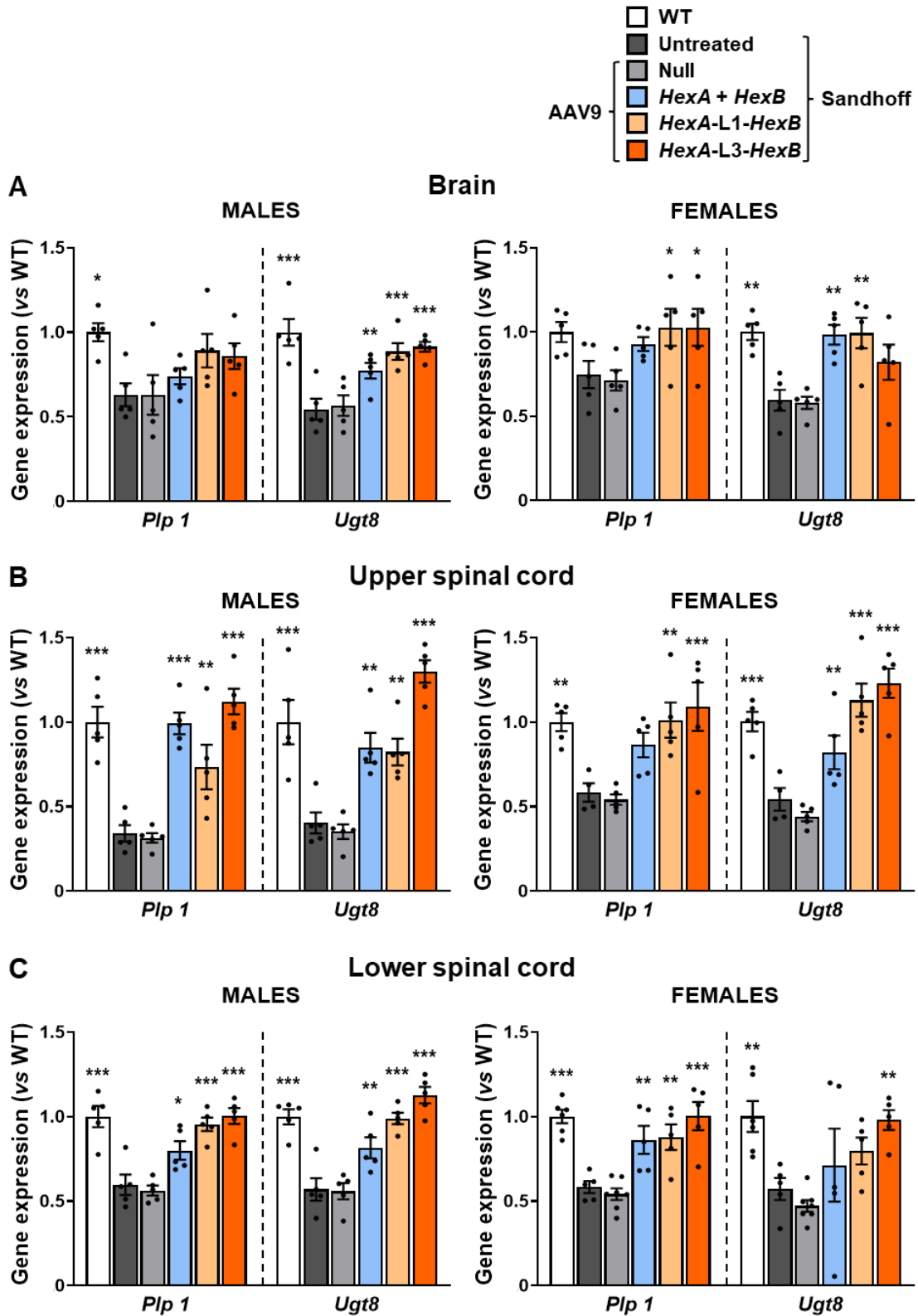


Figura 47. Normalització de la mielinització a l'encèfal i la medul·la espinal dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A-C) Avaluació de la mielinització mitjançant la quantificació de l'expressió dels gens *Plp1* i *Ugt8* per qPCR a les mostres de l'encèfal (A) i la regió cranial (B) i la regió caudal (C) de la medul·la espinal de ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-7 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i * $p < 0.001$ vs. *Null*.**

3. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUALS A LA PATOLOGIA DELS TEIXITS PERIFÈRICS

3.1. Estudi de l'activitat enzimàtica al fetge i al sèrum

Ja que els pacients presenten també certa patologia perifèrica és necessari un tractament que permeti corregir també les alteracions als altres òrgans i teixits perifèrics. Els vectors AAV9 administrats al LCR són capaços d'arribar a la sang perifèrica i transduir eficientment el fetge. D'aquesta forma, el fetge pot produir i secretar l'enzim al torrent circulatori, i així arribar a altres òrgans perifèrics no transduïts (Haurigot, 2013b; Motas, 2016; Ribera, 2015; Roca, 2017). Així doncs, per tal de comprovar la producció d'HEXA per part del fetge als ratolins afectats per la malaltia, es va determinar les activitats enzimàtiques de la β -hexosaminidasa al fetge i al sèrum dels animals Sandhoff tres mesos després de l'administració intra-LCR dels diferents vectors AAV9.

Així, es va observar un gran augment fins a nivells suprafisiològics de les activitats β -HEXO i HEXA al fetge dels ratolins tractats amb els vectors AAV9 duals i individuals, en comparació amb els animals Sandhoff no tractats i injectats amb els AAV9 *Null* (Figura 48 i 49). Els nivells tan elevats de β -HEXO i HEXA al fetge van resultar en una eficient secreció de l'enzim al torrent sanguini. Les activitats enzimàtiques al sèrum dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors duals i individuals van resultar molt elevades, a totes les edats analitzades (Figura 48 i 49). Pel que fa als vectors AAV9 individuals, es va observar un gran augment de l'activitat β -HEXO, tant al fetge com al sèrum, molt superior a l'aconseguida pels vectors AAV9 duals (Figura 48A i 49A). En canvi, els valors de l'activitat HEXA, més específica de la isoforma capaç de degradar el gangliòsid GM2, assolits al fetge i al sèrum pels vectors AAV9 duals eren molt superiors als assolits amb els vectors AAV9 individuals (Figura 48A i 49A). Aquesta diferència entre ambdues activitats segons els vectors AAV9 administrats podria ser deguda a que els vectors AAV9 individuals són capaços de generar la isoforma HEXB ($\beta\beta$), detectada únicament per l'activitat β -HEXO que mesura totes les isoformes; mentre que els vectors AAV9 duals únicament són capaços de generar la isoforma HEXA ($\alpha\beta$), detectada tant amb l'activitat β -HEXO com també, de manera més específica, amb l'activitat HEXA.

Cal remarcar que les femelles Sandhoff tractades presentaven diferències detectables en els nivells de transducció del fetge respecte als nivells observats en mascles Sandhoff tractats, ja que es va detectar un augment més elevat de les activitats β -HEXO i HEXA en mascles que en femelles (Figura 48A i 49A). Aquest fet ja s'havia

observat prèviament en altres estudis en ratolins, on independentment del promotor i el serotip d'AAV, la transducció al fetge de mascles per part dels vectors AAV era més eficient que en femelles (Haurigot, 2013b; Wang, 2005). Aquesta diferència només es va observar al fetge, i sembla que podria significar que els nivells d'andrògens poden influir a la seva transducció (Davidoff, 2003; Ruzo, 2012). Tot i això, la transducció als fetges de primats no humans no ha evidenciat diferències entre ambdós sexes (Binny, 2012). Per tant, aquesta diferència en els nivells de transducció al fetge detectada, actualment, als ratolins Sandhoff tractats no hauria d'observar-se en tractar pacients humans.

Tots aquests resultats ens van demostrar que amb l'administració intracisterna magna dels vectors AAV9 duals a una dosi d' 1×10^{11} vg/animal era suficient per obtenir una transducció molt elevada al fetge. A més, va permetre que el fetge actués com a òrgan secretor de l'enzim funcional al torrent circulatori per corregir altres òrgans perifèrics no transduïts pels vectors AAV9 duals.

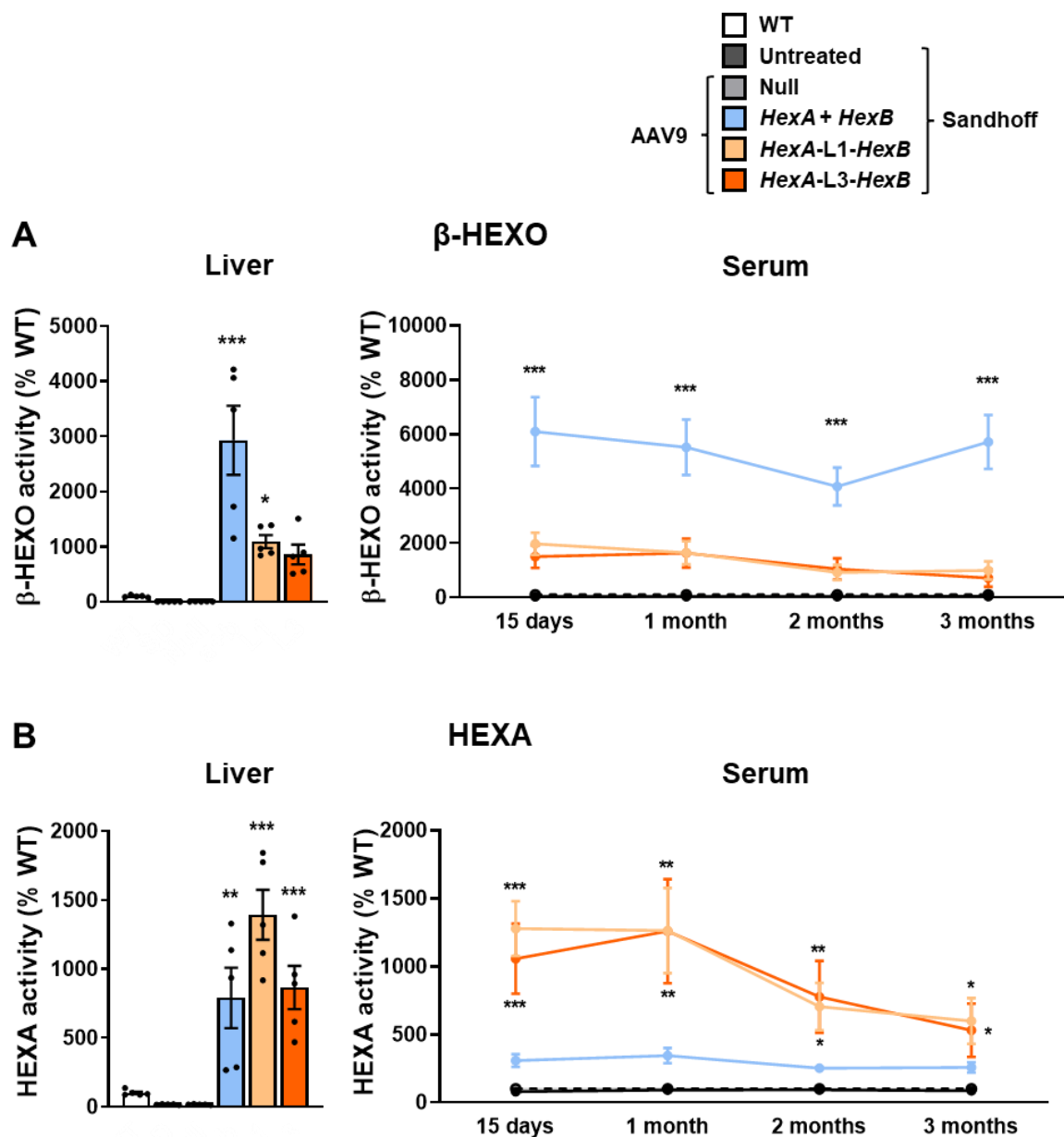


Figura 48. Activitat β -HEXO i HEXA al fetge i al sèrum dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) al fetge i al sèrum de ratolins mascles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal. El sèrums es van analitzar a 15 dies i 1, 2 i 3 mesos després de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 i els fetges es van analitzar 3 mesos post-injecció. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i * $p < 0.001$ vs. *Null*.**

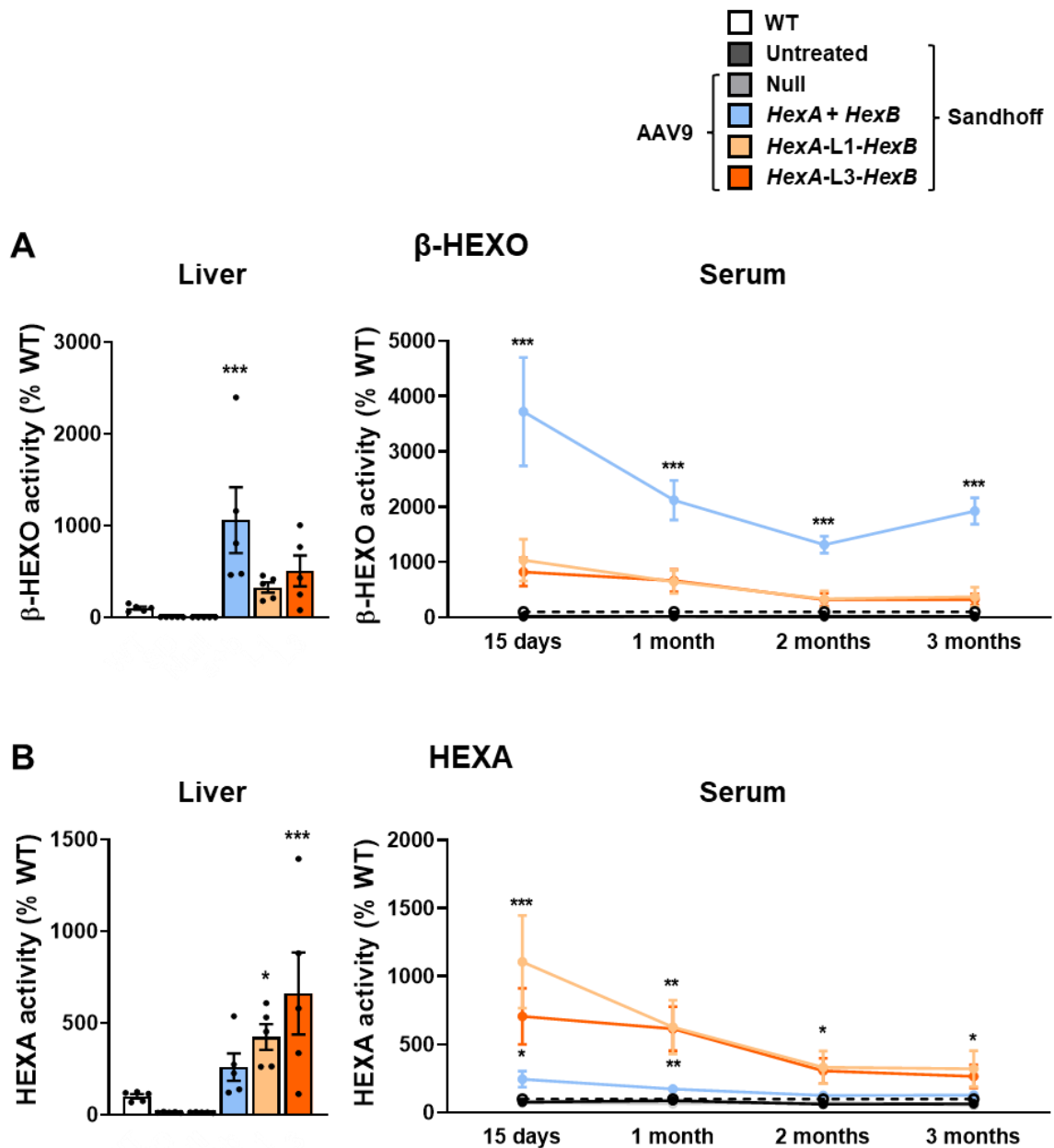


Figura 49. Activitat β -HEXO i HEXA al fetge i al sèrum dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) al fetge i al sèrum de ratolins femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal. El sèrums es van analitzar a 15 dies i 1, 2 i 3 mesos després de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 i els fetges es van analitzar 3 mesos post-injecció. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

3.2. Correcció de l'acumulació secundària dels GAGs en teixits perifèrics

Com que les tres isoformes de l'enzim β -hexosaminidasa també són capaces de degradar els GAGs, s'ha detectat la seva acumulació secundària als teixits tant de pacients com dels models animals de la malaltia de Sandhoff (Gray-Edwards, 2015; Ou, 2019).

Per avaluar l'efecte de la presència d'activitat β -hexosaminidasa al fetge i al sèrum en el contingut de GAGs a diferents teixits perifèrics dels ratolins Sandhoff, es van mesurar tres mesos després del tractament. En els diferents teixits analitzats, es va observar un augment del contingut de GAGs als animals Sandhoff no tractats i els injectats amb el vector AAV9 *Null*, en comparació amb els ratolins WT (Figura 50). En canvi, en els ratolins Sandhoff tractats, tant amb els vectors AAV9 duals com els AAV9 individuals, es va observar una reducció del contingut de GAGs a la majoria de teixits perifèrics analitzats, tant als mascles com a les femelles (Figura 50).

Per tant, l'administració dels vectors AAV9 duals directament al LCR al model murí de la malaltia de Sandhoff va ser suficient per corregir l'acumulació de GAGs a la majoria dels teixits i òrgans perifèrics analitzats.

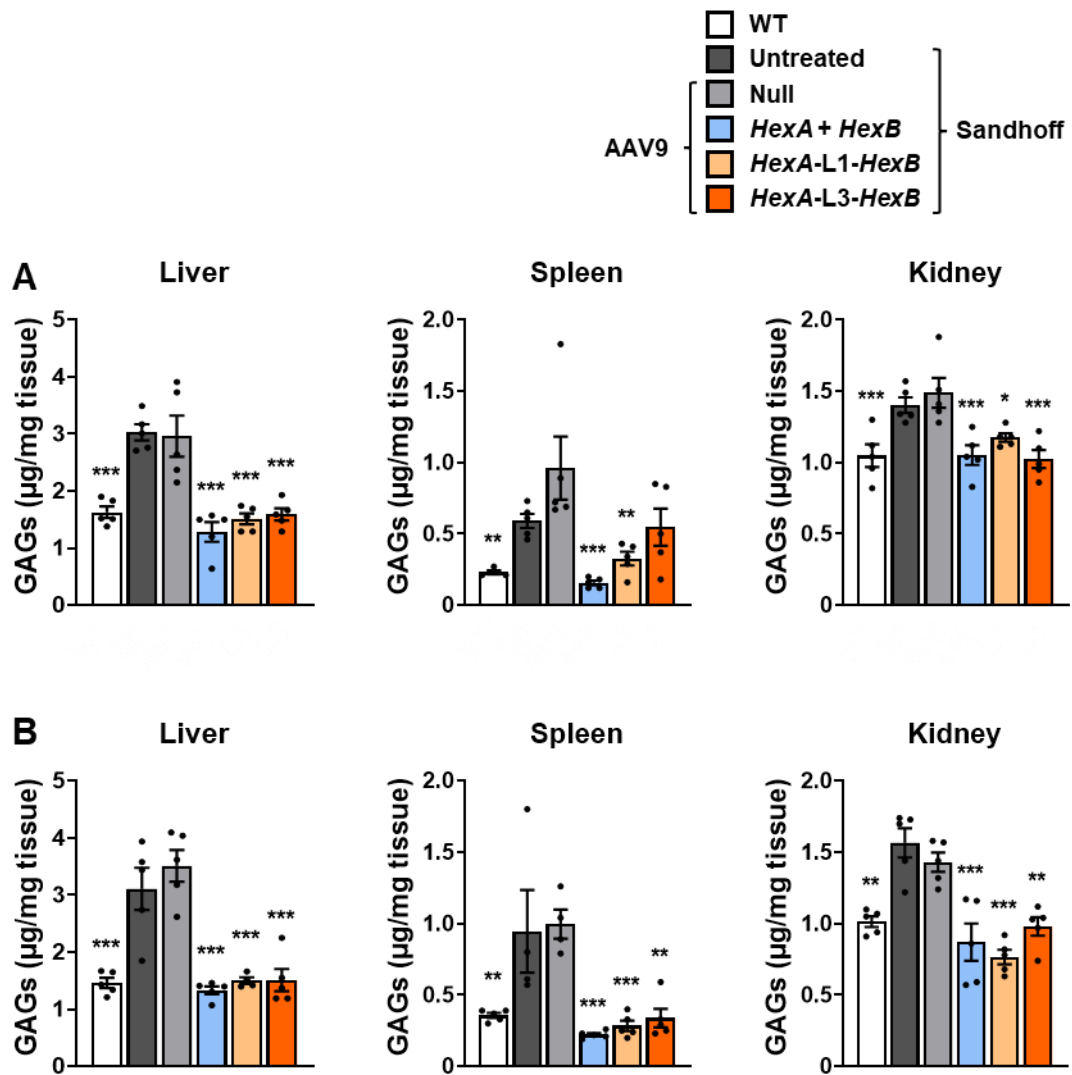


Figura 50. Reducció de l'acumulació de GAGs als teixits perifèrics dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Quantificació del contingut de GAGs al fetge, la melsa i el ronyó de ratolins mascles (A) i femelles (B) dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i * $p < 0.001$ vs. *Null*.**

3.3. Correcció de l'acumulació secundària del colesterol

També es va quantificar el contingut de colesterol total en mostres de fetge dels ratolins dels diferents grups experimentals als 4 mesos d'edat, en ambdós sexes. Als ratolins Sandhoff no tractats i injectats amb AAV9 *Null* es va detectar un augment al voltant del 25% del colesterol total, respecte als ratolins WT, evidenciant una acumulació secundària de colesterol (Figura 51). En canvi, els mascles i femelles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals o els AAV9 individuals van mostrar una reducció del colesterol total a nivells similars als dels animals WT (Figura 51).

Per tant, aquests resultats indicaven que l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de la malaltia va resultar en una normalització de l'acumulació secundària del colesterol al fetge.

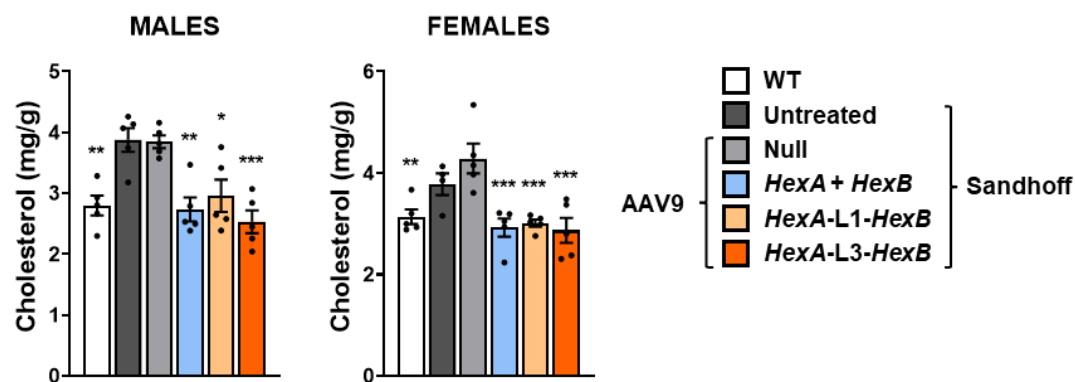


Figura 51. Normalització de l'acumulació del colesterol total al fetge dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. Determinació de l'acumulació de colesterol total als extractes lipídics del fetge de ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

3.4. Restauració de l'homeòstasi del lisosoma

En els teixits perifèrics, tal com es va observar prèviament al SNC, una acumulació patològica de substàncies no degradades a l'interior del lisosoma acaba provocant una desregulació d'altres enzims lisosòmics no afectats directament per la mutació causant de la malaltia (Haurigot, 2013b; Ribera, 2015). Per tant, l'acumulació primària com secundària al fetge del ratolins afectats per la malaltia de Sandhoff pot provocar una desregulació enzimàtica als lisosomes d'aquest òrgan.

Així doncs, es va estudiar l'homeòstasi lisosòmica mesurant l'activitat SGSH als extractes dels fetges dels ratolins dels diferents grups experimentals als 4 mesos d'edat. Es va detectar un augment de l'activitat SGSH als ratolins Sandhoff no tractats i als injectats amb el vector AAV9 *Null*, en comparació als animals WT, indicant una alteració de l'homeòstasi lisosòmica al fetge del model murí (Figura 52). En els animals administrats amb els vectors AAV9 duals o els AAV9 individuals, es va observar una normalització de l'activitat SGSH al fetge tant dels mascles com les femelles (Figura 52).

Aquest resultat va evidenciar la restauració de la desregulació enzimàtica al fetge del model murí de la malaltia de Sandhoff gràcies al tractament de teràpia gènica.

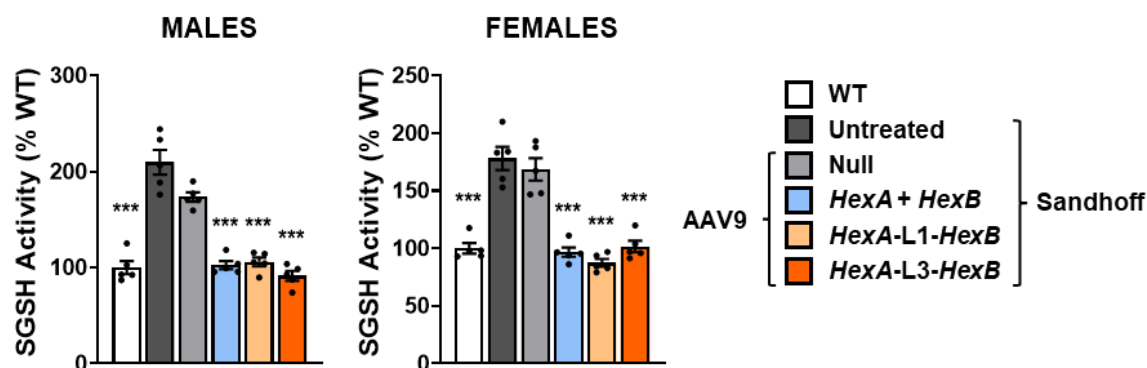


Figura 52. Recuperació de l'homeòstasi del lisosoma al fetge dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. Determinació de l'activitat de l'enzim lisosòmic SGSH als extractes proteics del fetge de ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 5 animals per grup. *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

4. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUALS EN LES ALTERACIONS DEL COMPORTAMENT

La malaltia de Sandhoff és una malaltia neurodegenerativa que en els humans s'inicia amb una aturada del desenvolupament que, en les formes més severes, acaba amb un estat semi-vegetatiu amb espasticitat, entre molts d'altres símptomes (Regier, 2016). Per avaluar l'efecte de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals en la millora dels problemes motors i de coordinació, es van realitzar una bateria de proves específiques en els ratolins dels diferents grups experimentals.

4.1. Anàlisi de l'activitat exploratòria i locomotora

Per estudiar l'activitat exploratòria i locomotora general dels ratolins en un entorn nou i desconegut es va realitzar la prova de l'actímetre. Aquesta prova només es va realitzar una única vegada als ratolins per tal que no s'habituin al test i, en conseqüència, s'alteri la seva manera d'actuar en aquest nou entorn (Marcó, 2016). L'arena quadrada, on es duu a terme la prova, es delimita virtualment en tres àrees quadrades concèntriques: el centre (el quadrat central), la vora (el quadrat més exterior) i la perifèria (tot l'espai excloent-hi el centre). Es va estudiar el moviment dels ratolins dels diferents grups experimentals als 4 mesos d'edat a les diverses regions de l'arena mitjançant l'ús d'una càmera.

En ambdós sexes, tant els ratolins Sandhoff no tractats com els injectats amb el vector AAV9 *Null* es va observar una comportament hipoactiu, evidenciat per una reducció de la distància total recorreguda i la recorreguda a la vora, creuar menys vegades les diferents zones de l'actímetre, estar més estona en repòs i destinar menys temps a desplaçar-se ja sigui a una velocitat lenta o més ràpida, en comparació als ratolins WT (Figura 53 i 54). El tractament amb els vectors AAV9 duals i individuals va resultar en una correcció dels dèficits del comportament locomotor, presentant diferències estadísticament significatives a pràcticament tots els paràmetres analitzats, respecte els ratolins Sandhoff tractats amb el vector AAV9 *Null* (Figura 53).

En general, aquests resultats van demostrar que l'administració intra-LCR dels vectors duals per mitjà d'un vector viral AAV9 a un mes d'edat als ratolins Sandhoff va resultar a una gran millora de l'activitat locomotora i exploratòria, tot indicant una correcció del comportament hipoactiu observat al model murí de la malaltia.

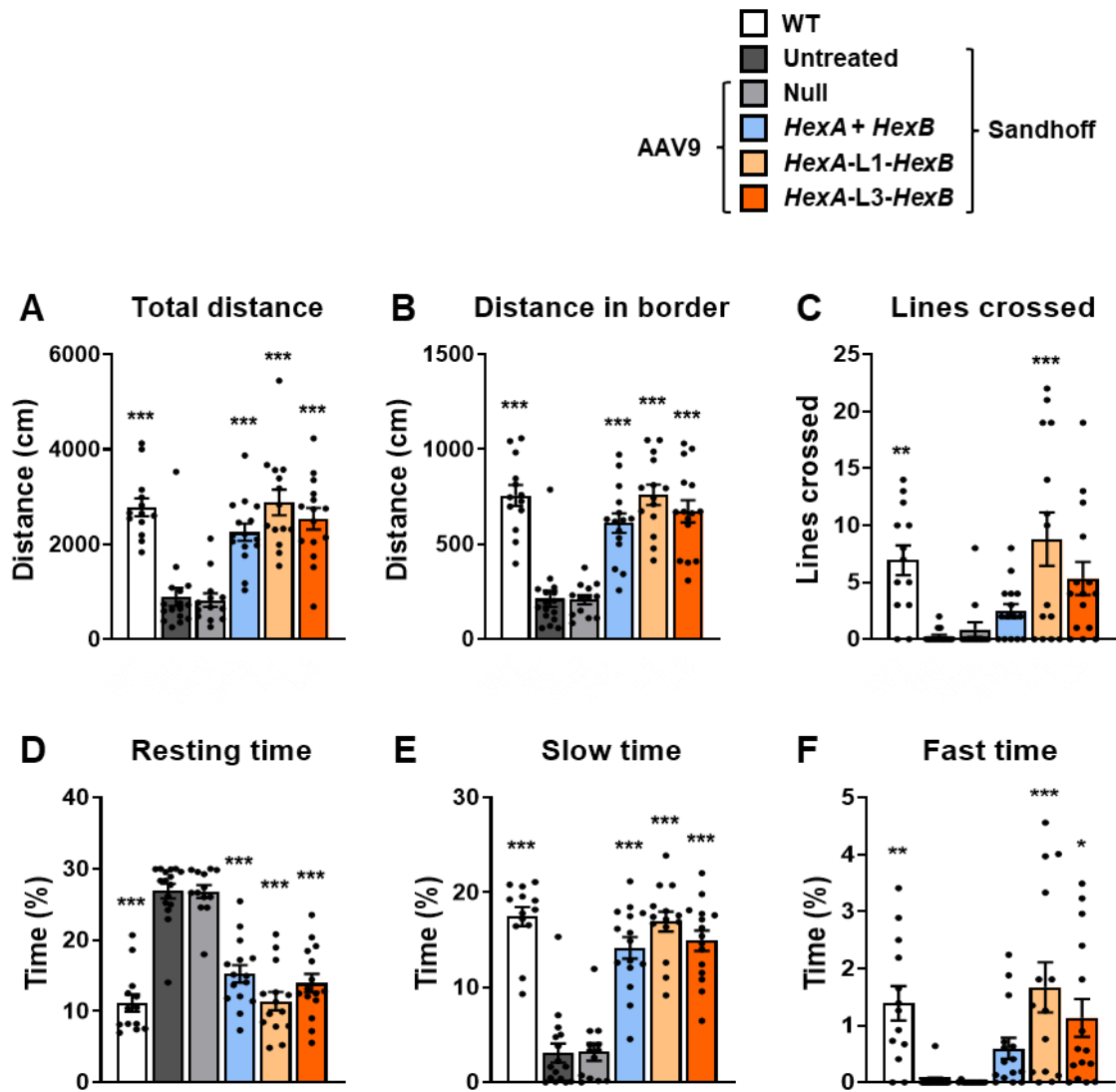


Figura 53. Correcció dels dèficits de comportament dels ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A-F) Resultats de la prova de l'actímetre de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els paràmetres analitzats amb el test de l'actímetre són els següents: distància total recorreguda (A), distància a la vora (B), número total de línies creuades (C), temps en repòs (D), temps recorregut a una velocitat lenta (E) i temps recorregut a una velocitat ràpida (F). Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 13-16 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

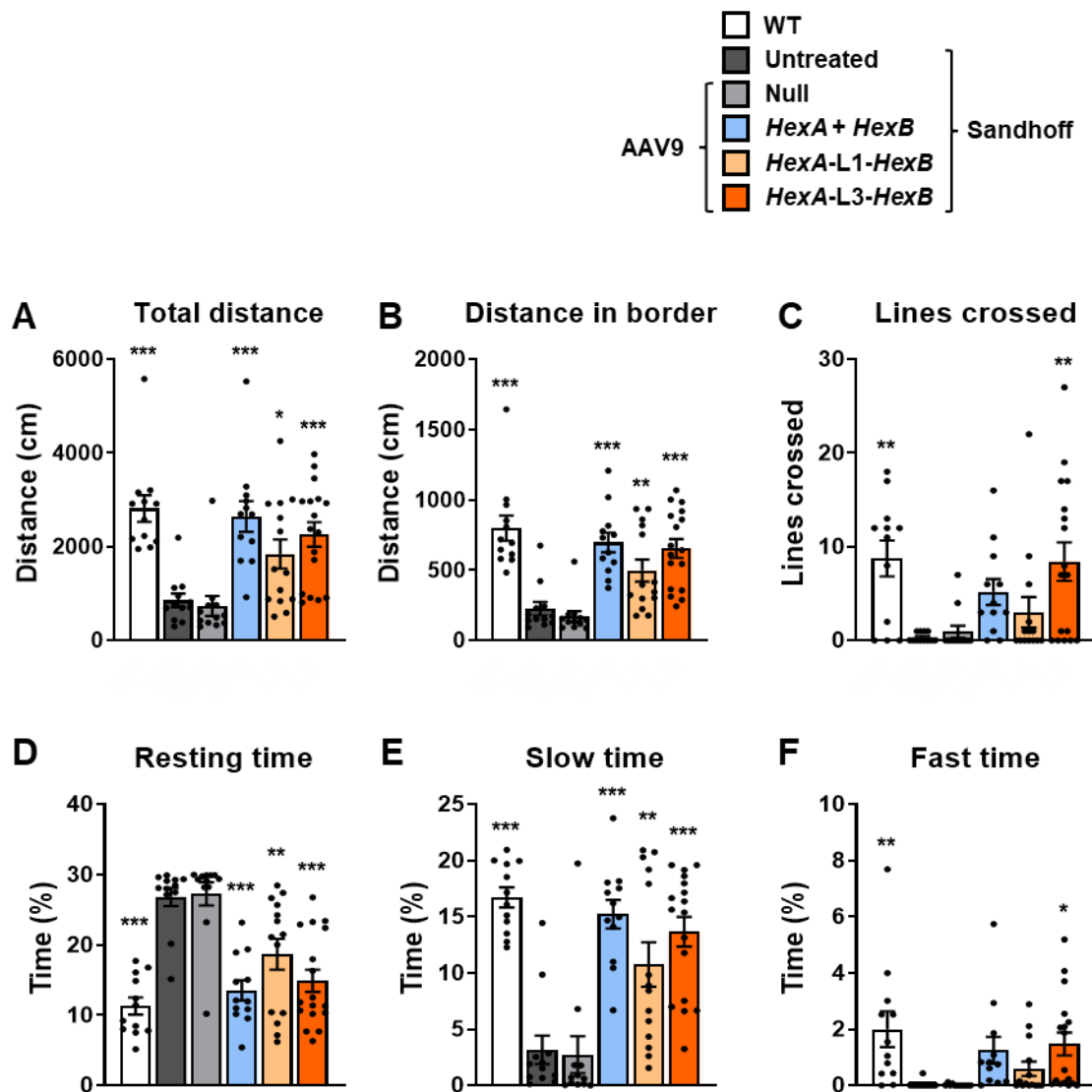


Figura 54. Correcció dels dèficits de comportament dels ratolins femelles Sandhoff tractades amb els vectors AAV9 duals. (A-F) Resultats de la prova de l'actímetre de ratolins dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 4 mesos d'edat. Els paràmetres analitzats amb el test de l'actímetre són els següents: distància total recorreguda (A), distància a la vora (B), número total de línies creuades (C), temps en repòs (D), temps recorregut a una velocitat lenta (E) i temps recorregut a una velocitat ràpida (F). Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 13-16 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

4.2. Avaluació de la coordinació

Els possibles problemes de coordinació associats a la malaltia de Sandhoff es van mesurar amb la prova del *rotarod*. El *rotarod* és un aparell que té un cilindre rotatori que accelera de forma constant on els ratolins hi caminen a sobre. Es va mesurar la latència a caure del *rotarod* dels diferents grups de ratolins a diverses edats.

A partir del tres mesos d'edat, tant als mascles com a les femelles Sandhoff no tractats, com als injectats amb el vector AAV9 *Null*, presentaven una pèrdua de la coordinació que va empitjorar dràsticament als 4 mesos d'edat, quan no van ser capaços de romandre més de 5 segons a la prova del *rotarod* (Figura 55). En aquests grups d'animals els 4 mesos va ser l'última edat que se'ls va poder realitzar el test ja que als 5 mesos el 100% dels animals estaven morts (Figura 55). Contràriament, els ratolins mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals van presentar, fins als 12 mesos d'edat, una latència a caure del *rotarod* similar a la dels animals WT (Figura 55A). De manera semblant, les femelles Sandhoff que van rebre el tractament amb els vectors AAV9 duals van mantenir uns nivells de coordinació indistingibles dels ratolins WT, durant totes les edats analitzades (Figura 55B).

En el cas dels mascles Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 individuals, es va observar una pèrdua de coordinació molt gran als 6 mesos d'edat, acompanyat d'una gran caiguda de la supervivència d'aquests ratolins a la següent edat analitzada, on només el 52% dels mascles vius per realitzar la prova del *rotarod* (Figura 55A). Pel que fa a les femelles tractades amb els vectors AAV9 individuals, també es va mesurar un augment de la latència a caure dels animals a partir dels 5 mesos d'edat, que es va mantenir estable amb el pas del temps, tot i el descens progressiu d'animals vius en aquest grup experimental (Figura 55B).

Aquestes dades van demostrar que els ratolins afectats per la malaltia de Sandhoff que van rebre l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals van mantenir una molt bona coordinació motora fins a un any després del tractament amb un percentatge d'animals vius similar als ratolins WT. Per contra, els ratolins tractats amb els vectors AAV9 individuals van presentar una pèrdua de coordinació a partir dels 5 mesos d'edat acompanyada d'un dràstic augment de la mortalitat.

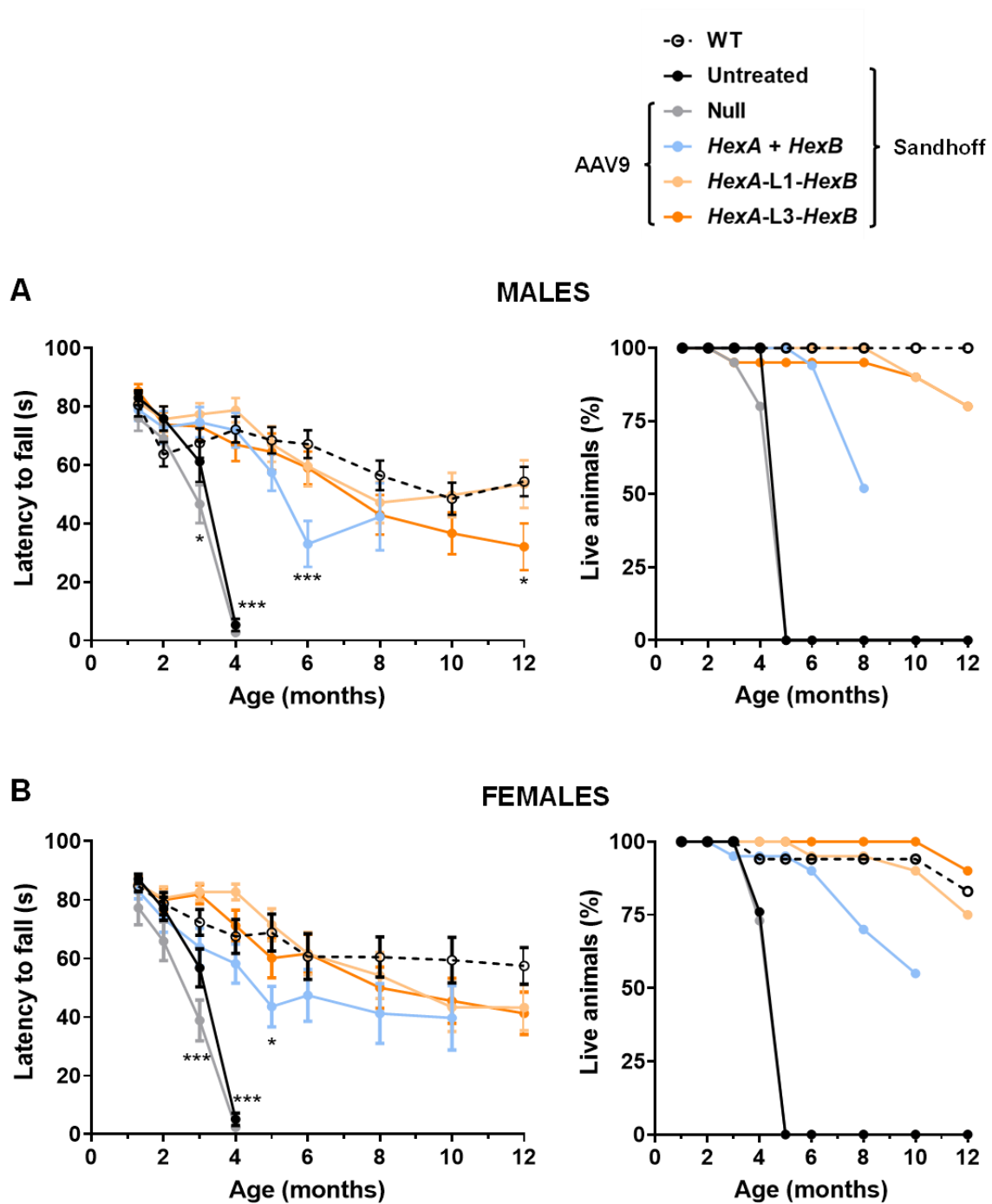


Figura 55. Correcció de la coordinació motora dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) La coordinació es va mesurar amb la prova del rotarod als ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal. Es va realitzar la prova del rotarod als mascles **(A)** i a les femelles **(B)** a diverses edats. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 9-27 animals per grup. * $p < 0.05$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

4.3. Anàlisi de la coordinació i la força muscular

Un altra prova per mesurar la capacitat de coordinació motora i la força muscular dels ratolins Sandhoff, és amb la prova del *mesh test* (Kim, 2010; Osmon, 2018). Aquest test consisteix a col·locar els ratolins sobre una reixa metàl·lica que s'inverteix, deixant el ratolí suspès cap per avall mentre explora la reixa.

En ambdós sexes, els ratolins Sandhoff no tractats i els injectats amb el vector AAV9 *Null*, van presentar una disminució de la latència a caure de la reixa invertida; mentre que els animals Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals i els AAV9 individuals es van mantenir a la reixa invertida durant un temps similar al dels animals WT (Figura 56).

Aquests resultats van evidenciar que l'administració dels vectors AAV9 duals era suficient per normalitzar els nivells de coordinació i força muscular al model murí de la malaltia de Sandhoff als 4 mesos d'edat.

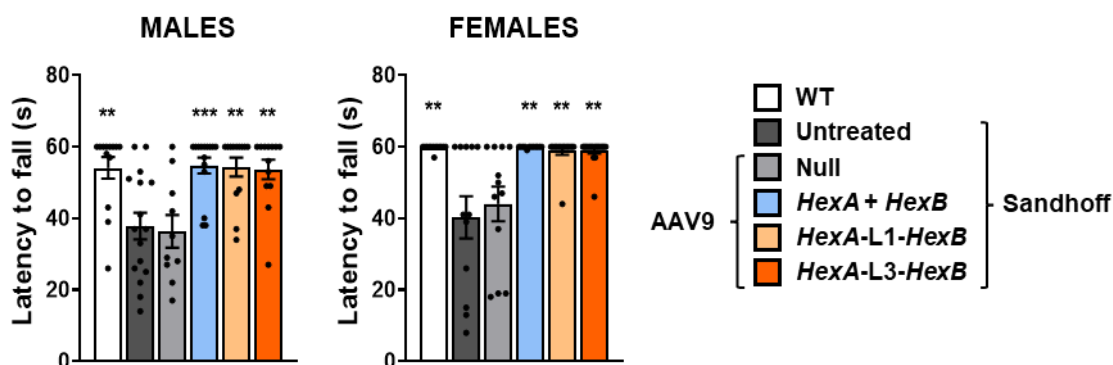


Figura 56. Normalització de la coordinació i la força muscular dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. La coordinació i la força muscular es van mesurar amb la prova del *mesh test* als ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es va analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 10-18 animals per grup. ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

4.4. Estudi de la mobilitat en els ratolins tractats amb els vectors AAV9 duals

Tenint en compte els problemes motors associats a la malaltia de Sandhoff, un altre aspecte important a mesurar és la mobilitat dels ratolins Sandhoff. El test del *righting reflex* permet avaluar la capacitat del ratolí de tornar-se a girar sobre ell mateix, si el col·loques d'esquena. Es va realitzar el test del *righting reflex* als 4 mesos d'edat. Tant en els animals Sandhoff no tractats com els injectats amb el vector *Null*, d'ambdós sexes, es va observar un augment en el temps que tardaven en girar-se sobre si

mateixos, comparat amb els animals WT, que van trigar menys d'un segon indicant una mobilitat intacta (Figura 57). Pràcticament la totalitat dels ratolins que van rebre l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals o els AAV9 individuals van tardar menys d'un segon a girar-se sobre si mateixos, assolint un comportament similar al dels animals WT i indicant una correcció de la mobilitat (Figura 57).

Per tant, el tractament de teràpia gènica basat en l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals, a part de normalitzar les alteracions locomotores, de coordinació i de força muscular, també va ser capaç de normalitzar les alteracions de mobilitat observades als ratolins Sandhoff no tractats i injectats amb el vector *Null*.

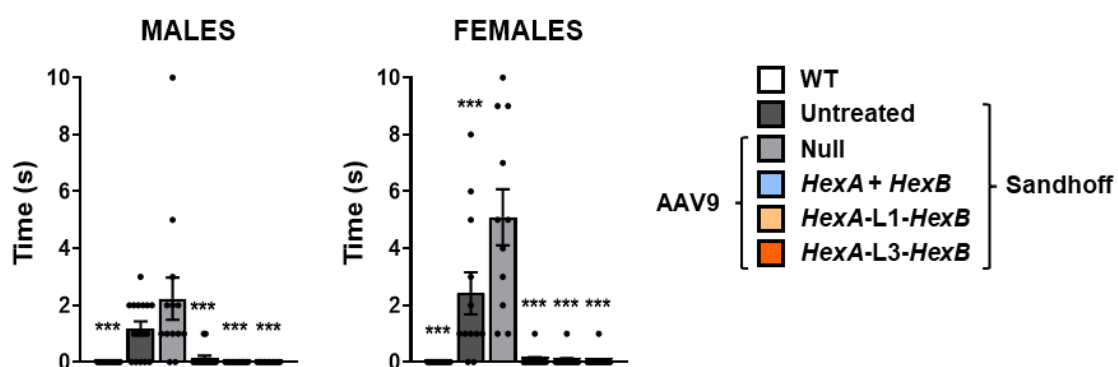


Figura 57. Recuperació de la mobilitat dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. La mobilitat es va mesurar amb la prova del righting reflex als ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es va analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 11-18 animals per grup. *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

4.5. Estudi de les anormalitats neurològiques

La prova del *hindlimb clasping* s'utilitza com a marcador de la progressió de la malaltia en diferents models animals neurodegeneratius (Guyenet, 2010; Lalonde, 2011), permetent avaluar les anormalitats neurològiques (Antipova, 2018). Per realitzar-la, cal agafar el ratolí per la base de la cua i mantenir-lo elevat durant 10 s. Seguidament, s'avalua la posició que tenen les seves extremitats posteriors: un 0, quan estan desplegadas cap a l'exterior, lluny del seu abdomen; un 1, quan una d'elles es retreu cap a l'abdomen durant més del 50% del temps; un 2, quan les dues extremitats estan parcialment retretes cap a l'abdomen durant més del 50% del temps; i finalment, un 3, quan estan totalment retretes i toquen l'abdomen durant més del 50% del temps (Lalonde et al., 2011).

Els ratolins mascles Sandhoff no tractats i injectats amb el vector AAV9 *Null* tenien una puntuació més alta de severitat (Figura 58). En canvi, els ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals disminuïen aquesta puntuació fins a valors similars als dels animals WT, en ambdós sexes (Figura 58). Per contra, els ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 individuals només van presentar una reducció parcial, sense diferències estadísticament significatives en cap sexe, indicant que la malaltia en aquests animals tractats estava a una fase més avançada (Figura 58).

Aquests resultats van demostrar que hi va haver una aturada o una recuperació de la progressió de la malaltia de Sandhoff després de l'administració dels vectors AAV9 duals.

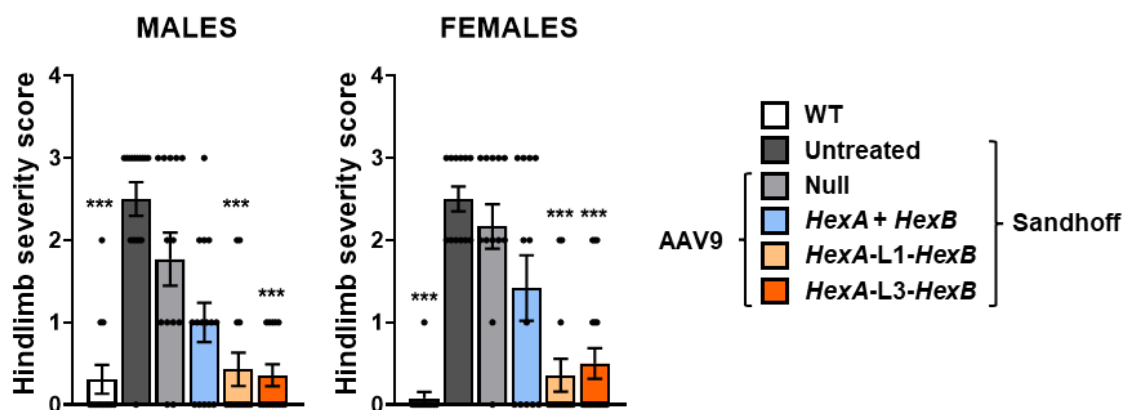


Figura 58. Anàlisi de les anomalies neurològiques als ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. La progressió de la malaltia es va mesurar amb la prova del Hindlimb clasping als ratolins mascles i femelles dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es va analitzar els 4 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 12-18 animals per grup. *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

5. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB ELS VECTORS AAV9 DUAL EN LA SUPERVIVÈNCIA

Un dels paràmetres més característics de la malaltia Sandhoff és la mort primerenca dels pacients (Sun, 2021) També, es va mesurar que els ratolins Sandhoff tenien un escurçament de la mediana de vida (Figura 17). Així doncs, es va analitzar l'efecte del tractament amb vectors AAV9 duals a la supervivència. Mentre que els ratolins mascles i femelles Sandhoff no tractats mostraven una mediana de supervivència de 4,3 i 4,25 mesos d'edat, respectivament, els ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals van allargar significativament la supervivència (Figura 59). Als 4,5 mesos d'edat, el 100% i més del 97,5% dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB*, respectivament, estaven vius en comparació amb els animals Sandhoff no tractats i injectats amb el vector AAV9 *Null* que estaven tots morts (Figura 59). Els mascles Sandhoff tractats amb ambdós vectors duals van presentar una corba de supervivència molt similar, on el vector AAV9 *HexA-L1-HexB* tenia una mediana de supervivència de 20,72 mesos, mentre que l'*HexA-L3-HexB* era de 22,63 mesos d'edat (Figura 59A). En femelles, la mediana de supervivència era lleugerament superior amb el vector duals *HexA-L3-HexB* (17,5 mesos d'edat), respecte a l'*HexA-L1-HexB* (16,5 mesos d'edat) (Figura 59B). Pel que fa als vectors AAV9 individuals, es va observar una mort més prematura dels ratolins Sandhoff tractats, en comparació als animals tractats amb els vectors AAV9 duals (Figura 59).

En conjunt, totes aquestes dades indiquen que els vectors AAV9 duals administrats directament al LCR van resultar en una prolongació de la supervivència dels ratolins Sandhoff d'ambdós sexes d'aproximadament unes 4,7 i 5,2 vegades en mascles i 3,8 i 4 vegades en femelles amb l'AAV9-*HexA-L1-HexB* i l'AAV9-*HexA-L3-HexB*, respectivament. A més, els vectors AAV9 duals *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB* van presentar un efecte terapèutic molt superior en la supervivència en comparació amb els animals Sandhoff tractats alhora amb els dos AAV9 individuals.

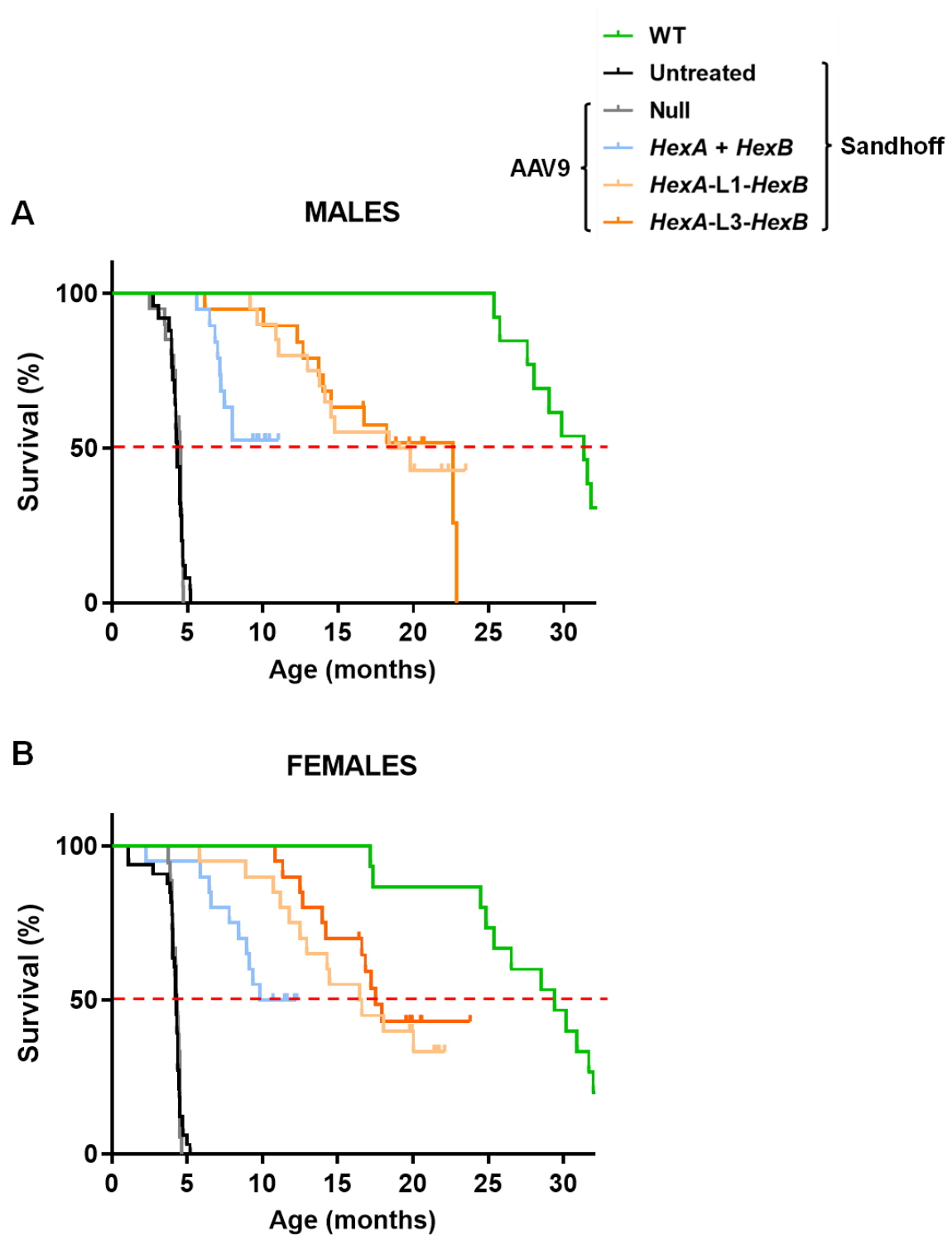


Figura 59. Estudi de la supervivència dels ratolins Sandhoff tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Representació de les corbes de supervivència, mitjançant la representació de Kaplan-Meier, de ratolins mascles (A) i femelles (B) dels diferents grups experimentals. A un mes d'edat, els ratolins Sandhoff van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal. Dades 13-25 animals per grup.

En conjunt, tots aquests resultats van demostrar que l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals que codificaven simultàniament per ambdós gens units per un *linker* al model murí de la malaltia de Sandhoff va resultar en un augment significatiu dels nivells d'activitat HEXA i β -HEXO, tant a l'encèfal com al fetge i al sèrum. Aquest increment de les activitats va conduir a la reversió dels diversos processos patològics característics de la malaltia, tant al SNC com als òrgans i teixits perifèrics, així com una normalització de les alteracions de comportament, principalment les alteracions locomotores, de coordinació i mobilitat, i una prolongació de la supervivència.

***Part 4. Estudi de l'eficàcia terapèutica dels
vectors duals per al tractament de la
malaltia de Tay-Sachs***

1. DISENY EXPERIMENTAL

Un cop demostrat el benefici terapèutic del tractament de teràpia gènica basat en l'administració a la cisterna magna dels vectors AAV9 dual en el model murí de la malaltia de Sandhoff, es va estudiar el possible efecte d'aquest tractament al model murí de la malaltia de Tay-Sachs, tot i que no presentaven alteracions patològiques.

Per aquest motiu, es van administrar directament al LCR, una dosi d' 1×10^{11} vg/animal dels vectors AAV9 duals (*HexA-L1-HexB* o *HexA-L3-HexB*) als ratolins Tay-Sachs de 2 mesos d'edat. Com a controls, es van utilitzar els animals WT i els ratolins Tay-Sachs no tractats o injectats amb el vector AAV9 *Null*, a una dosi d' 1×10^{11} vg/animal, o tractats amb els vectors AAV9 individuals a una dosi d' 1×10^{11} vg/vector (dosi total de 2×10^{11} vg/animal). Donat que el ratolí de Tay-Sachs no presenta el fenotip característic de la malaltia humana (Phaneuf, 1996; Taniike, 1995), únicament es va determinar si el tractament era capaç d'incrementar l'activitat β -hexosaminidasa tant a l'encèfal com al fetge i al sèrum, tres mesos després del tractament (Figura 60).

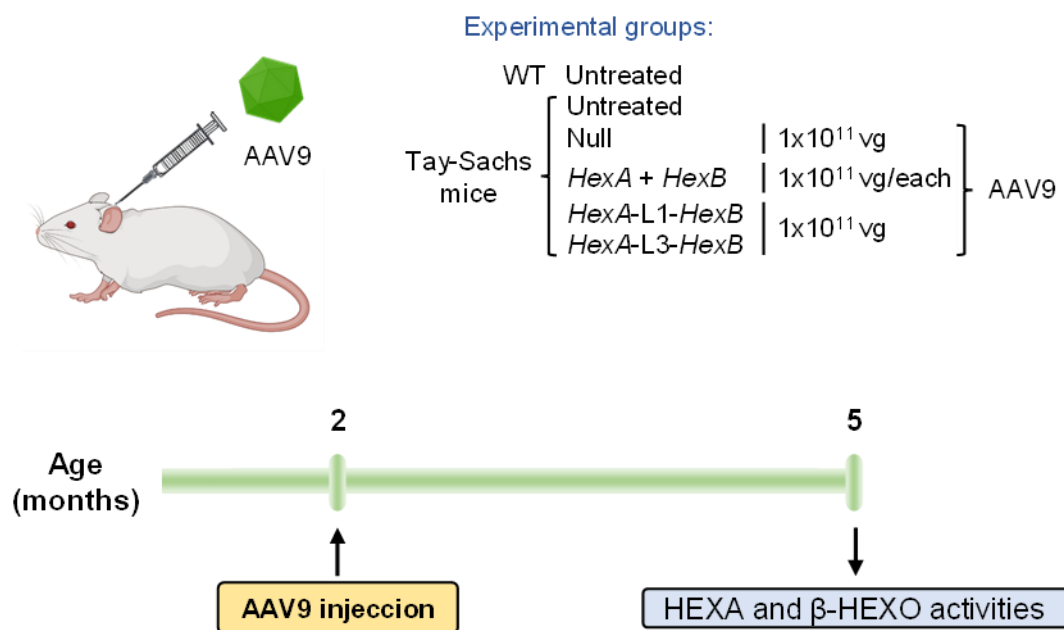


Figura 60. Disseny experimental. Els vectors AAV9 (*Null*, *HexA + HexB*, *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB*) es van administrar per via intracisterna magna al LCR dels ratolins mascles i femelles Tay-Sachs a 2 mesos d'edat. En el cas dels vectors AAV9 individuals, es van administrar 1×10^{11} vg de cada vector per animal, a una dosi total de 2×10^{11} vg/animal; mentre que els vectors AAV9 duals i *Null*, a una dosi d' 1×10^{11} vg/animal. Com a grups control, es van utilitzar els ratolins WT, Tay-Sachs no tractats, tractats amb el vector *Null* o els dos vectors AAV9 individuals (*HexA + HexB*). Per tal d'avaluar l'efecte del tractament, es van eutanasiar els ratolins 3 mesos després de l'administració dels vectors i es va mesurar les activitats β -hexosaminidases a diferents regions de l'encèfal, al fetge i al sèrum.

2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA AL SNC

En primer lloc, es va determinar les activitats β -HEXO i HEXA a diferents regions de l'encèfal dels ratolins dels diferents grups experimentals tres mesos després de l'administració intra-LCR. A causa de l'expressió normal del gen *HexB* (β) que resulta en la formació de l'isoenzim HEXB ($\beta\beta$), no es va detectar una gran davallada de l'activitat β -HEXO a les diferents regions de l'encèfal dels mascles i femelles Tay-Sachs no tractats o injectats amb el vector *Null* (Figura 61A i 62A). Com a conseqüència, els ratolins Tay-Sachs tractats amb els vectors AAV9 duals i individuals d'ambdós sexes no van presentar un augment destacable de l'activitat β -HEXO, en comparació amb els animals control injectats amb *Null* (Figura 61A i 62A).

Contràriament, l'activitat HEXA, que mesura l'activitat de l'isoenzim HEXA i HEXS, va reduir-se dràsticament als ratolins malalts no tractats i els injectats amb el vector AAV9 *Null* d'ambdós sexes (Figura 61B i 62B). El tractament amb els vectors AAV9 duals va resultar en un augment remarcable a totes les zones de l'encèfal analitzades del ratolí (Figura 61B i 62B). A més, els valors d'activitat detectats a les diferents regions de l'encèfal són relativament homogenis, des de les àrees més properes, fins i tot, a les més llunyanes al punt d'injecció dels vectors (Figura 61B i 62B).

En canvi, els ratolins Tay-Sachs tractats amb els vectors AAV9 individuals van mostrar una distribució més heterogènia de l'activitat HEXA a les diferents regions de l'encèfal analitzades, amb un gran augment de l'activitat als punts més pròxims a l'administració, que cau a nivells molt baixos a les regions més llunyanes (Figura 61B i 62B). Cal destacar que, en general, el vector *HexA-L3-HexB* va presentar uns nivells d'activitat HEXA lleugerament superior als detectats amb el vector *HexA-L1-HexB*, assolint diferències estadísticament significatives a la majoria de regions del SNC analitzades, tant de mascles com femelles Tay-Sachs tractats (Figura 61B i 62B).

En conjunt, aquests resultats van evidenciar que, tres mesos després de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals, es va mesurar un augment de l'activitat HEXA, una activitat més específica de l'isoenzim capaç de degradar el gangliòsid GM2, a tot l'encèfal del ratolins Tay-Sachs tractats. Aquests nivells d'activitat assolits després del tractament serien suficients per contrarestar la patologia del SNC, tal com es va demostrar amb la mateixa aproximació terapèutica testada al model murí de la malaltia de Sandhoff.

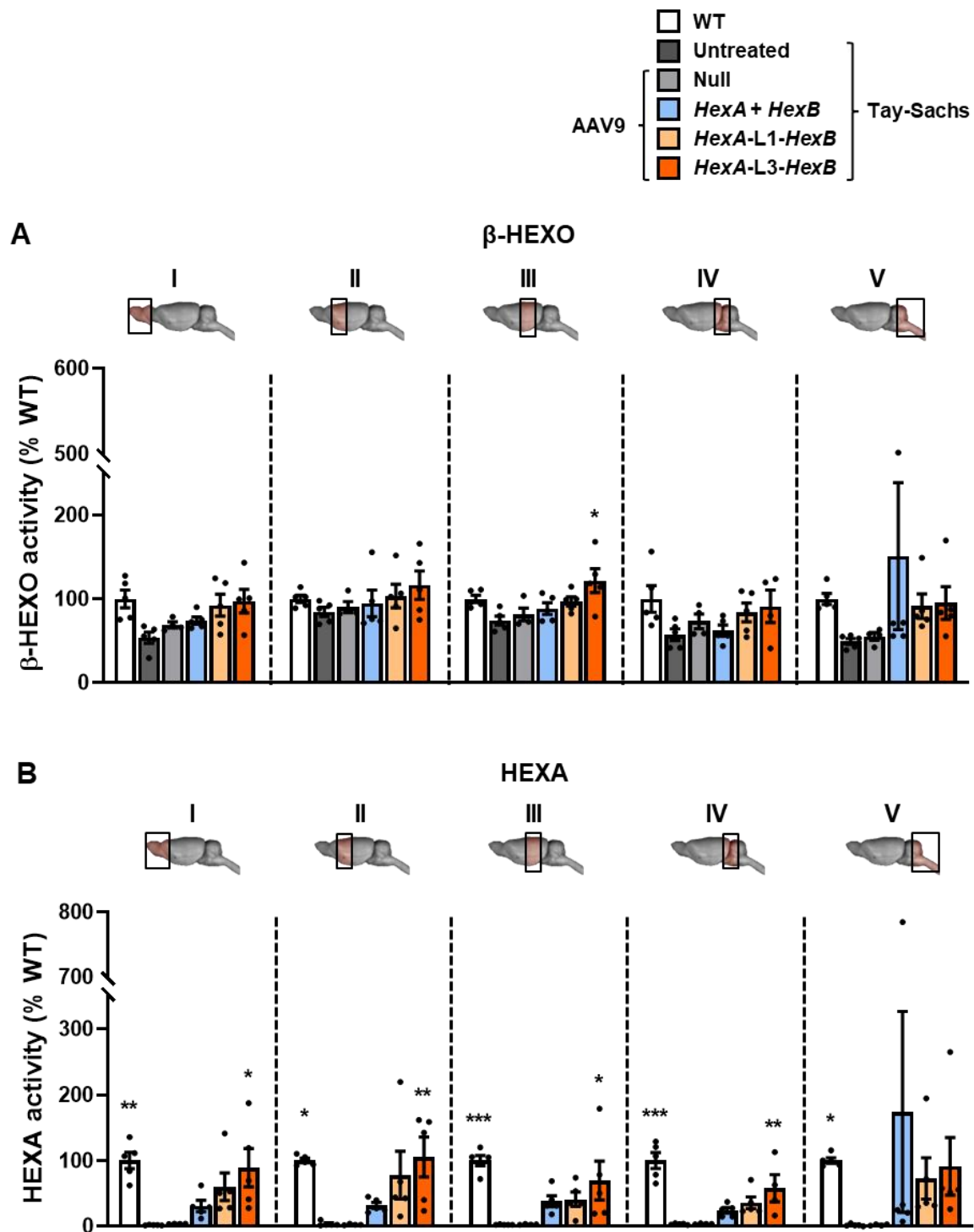


Figura 61. Activitats β -HEXO i HEXA a l'encèfal dels ratlins mascles Tay-Sachs tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) a diferents regions de l'encèfal (I-V) de ratlins dels diferents grups experimentals. A 2 mesos d'edat, els ratlins Tay-Sachs van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 5 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

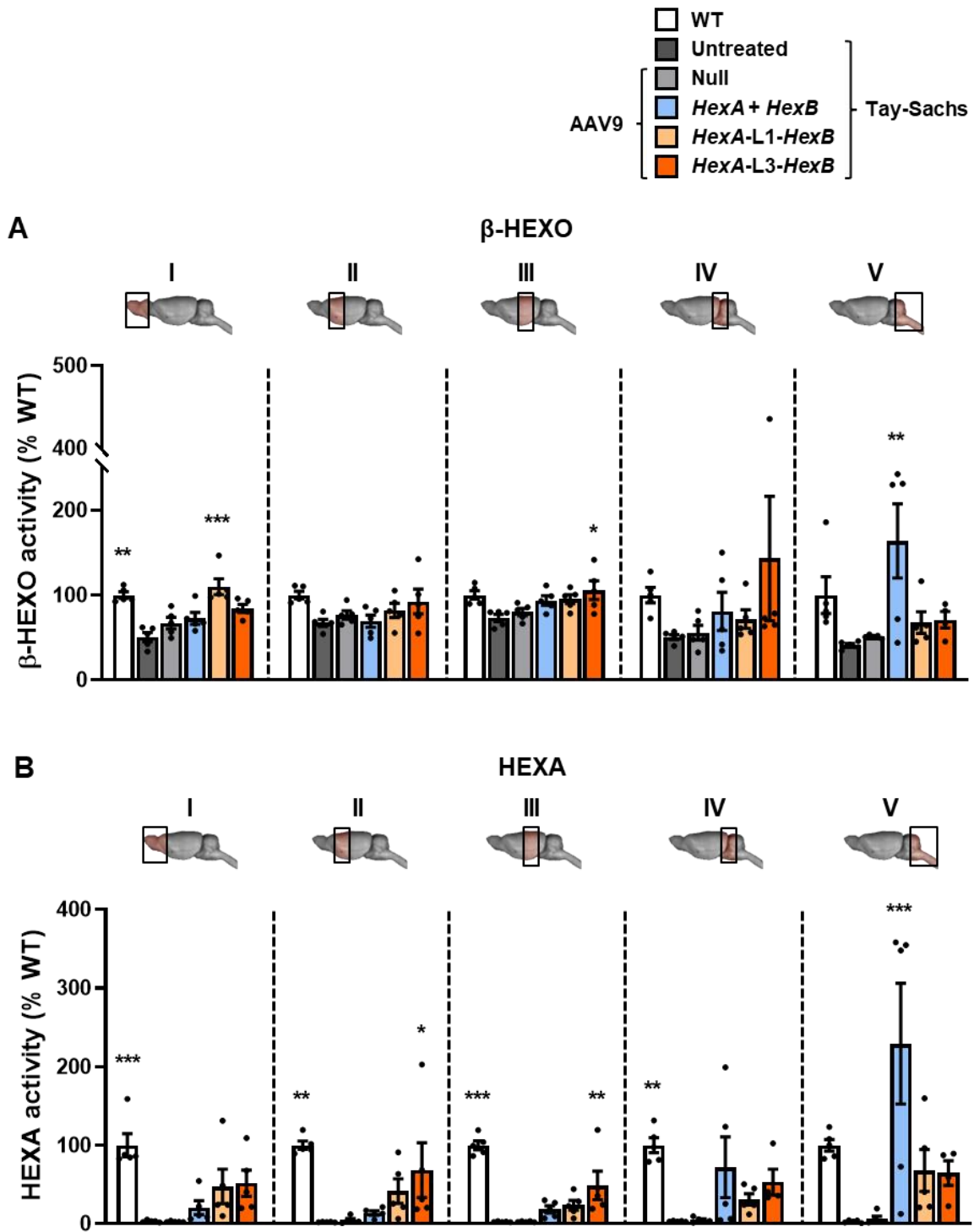


Figura 62. Activitats β -HEXO i HEXA a l'encèfal dels ratolins femelles Tay-Sachs tractades amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β -HEXO (A) i HEXA (B) a diferents regions de l'encèfal (I-V) de ratolins dels diferents grups experimentals. A 2 mesos d'edat, els ratolins Tay-Sachs van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA* + *HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 5 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana \pm SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

3. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA AL FETGE I AL SÈRUM

A continuació es van determinar les activitats β -HEXO i HEXA al fetge i al sèrum dels mateixos grups experimentals. Tal com s'havia detectat prèviament al model murí de la malaltia de Sandhoff tractat amb els vectors AAV9 duals i individuals, el fetge i els sèrums dels ratolins Tay-Sachs tractats van presentar un gran augment dels nivells de les activitats β -HEXO i HEXA (Figura 63). En general, no es van observar diferències entre els nivells d'activitat dels animals tractats amb els vectors *HexA-L1-HexB* o *HexA-L3-HexB* (Figura 63).

Si es comparen el valor de les activitats del fetge entre mascles i femelles Tay-Sachs tractats, es pot tornar a comprovar que els vectors AAV9 transdueixen més eficientment el fetge dels mascles (Figura 63), tal com es va detectar al model murí de la malaltia de Sandhoff i també s'ha observat prèviament en d'altres models animals i amb d'altres vectors AAV de diferents fenotips (Davidoff, 2003; Wang, 2005).

Aquestes dades demostren que l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de la malaltia de Tay-Sachs també condueix a una molt bona transducció del fetge que va resultar en una secreció eficient de la proteïna al torrent circulatori.

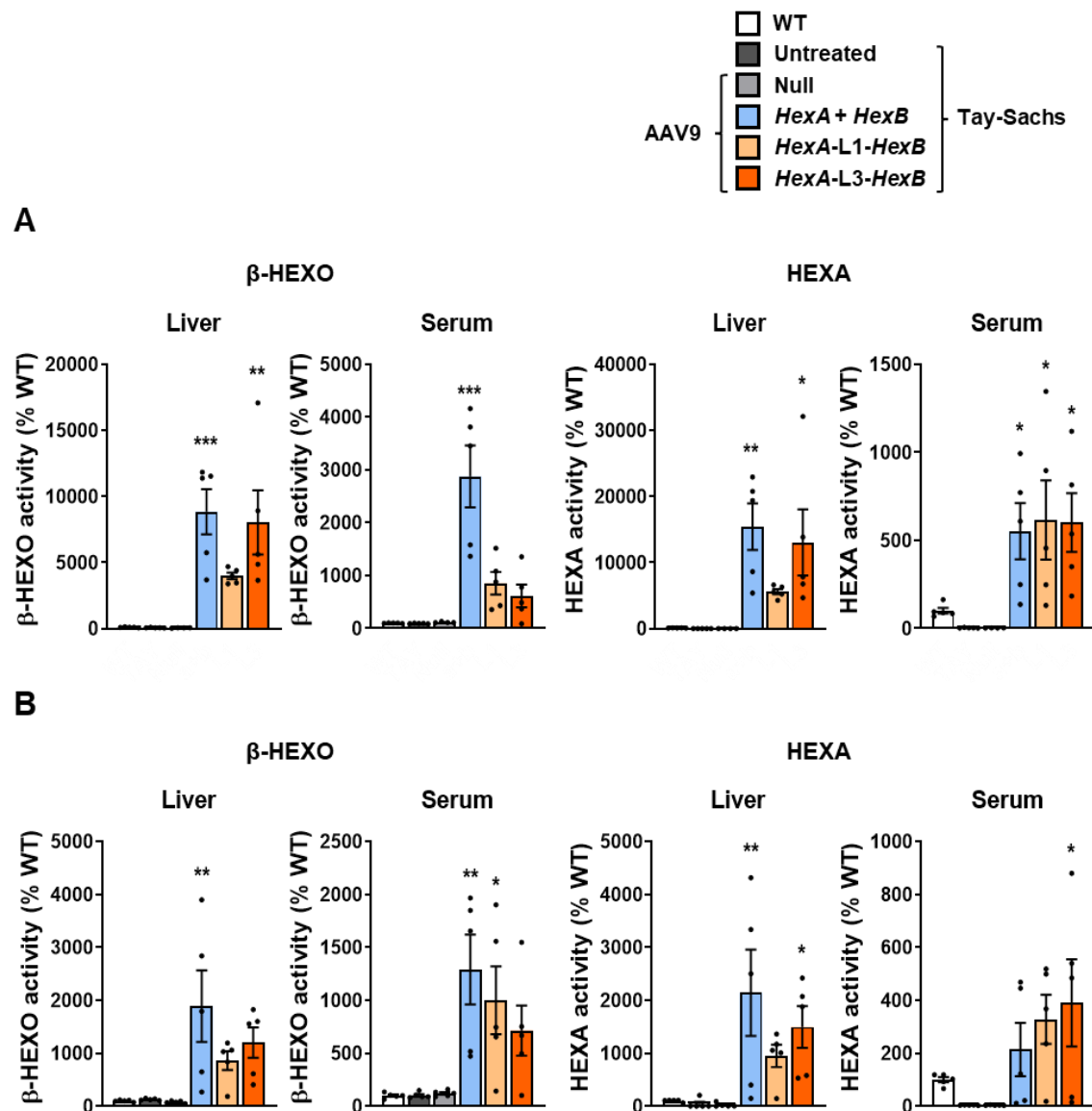


Figura 63. Activitats β-HEXO i HEXA al fetge i al sèrum dels ratolins Tay-Sachs tractats amb els vectors AAV9 duals. (A, B) Determinació de l'activitat β-HEXO i HEXA al fetge i al sèrum de ratolins mascles (A) i femelles (B) dels diferents grups experimentals. A 2 mesos d'edat, els ratolins Tay-Sachs van rebre una administració al LCR a una dosi total de: *HexA + HexB* de 2×10^{11} vg/animal i duals i *Null* de 1×10^{11} vg/animal i es van analitzar els 5 mesos d'edat. Els resultats s'expressen com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ vs. *Null*.

Així doncs, aquesta aproximació terapèutica va conduir a uns increment dels nivells d'activitat β-hexosaminidasa a l'encèfal, com també al fetge que actua com a bomba productora i secretora de l'enzim funcional al torrent sanguini per tal de corregir la patologia a d'altres òrgans no transduïts pels vectors AAV9 duals. Els resultats d'activitat mesurats en el model murí de la malaltia de Tay-Sachs, podrien ser suficients per revertir la patologia del SNC com perifèrica, tal com es va demostrar prèviament amb el model animal de la malaltia de Sandhoff.

V.DISCUSSIÓ

Tay-Sachs i Sandhoff són unes malalties d'acumulació lisosòmica provocades per la deficiència de la β -hexosaminidasa A (HEXA), un enzim necessari pel catabolisme del gangliòsid GM2. HEXA està compost de dues subunitats, l' α i la β , codificades pels gens *HEXA* i *HEXB*, respectivament. La malaltia de Tay-Sachs es causada per mutacions en el gen *HEXA*, mentre que la malaltia de Sandhoff és causada per mutacions en el gen *HEXB*. Es tracten d'unes malalties monogèniques amb una herència autosòmica recessiva i una incidència de 1/320.000 i 1/422.000 naixements per la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, respectivament. Clínicament, tant la malaltia de Tay-Sachs com la de Sandhoff són malalties severes, neurodegeneratives i són pràcticament indistingibles entre elles. Presenten una afectació molt severa al SNC i només en el cas de la malaltia de Sandhoff s'observa una patologia somàtica més lleu. Hi ha un ampli espectre de signes i símptomes clínics en els pacients d'aquestes malalties, sent les formes infantils les més habituals, però també existeixen les formes juvenils i les d'inici tardà. Generalment, els pacients d'ambdues malalties presenten alteracions en el desenvolupament, neuroinflamació, convulsions, problemes motors, rigidesa i un ràpid deteriorament que, en les formes infantils, acaba amb la mort prematura abans dels 5 anys d'edat, mentre que en les juvenils abans de la segona dècada de vida. Cal destacar que les formes adultes no sempre presenten una esperança de vida reduïda.

Actualment, no hi ha cap tractament aprovat per les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, evidenciant la necessitat de trobar noves aproximacions terapèutiques per al seu tractament. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors AAV és una alternativa molt prometedora, gràcies a l'eficàcia terapèutica demostrada en el tractament a llarg termini de diferents malalties, després d'una única administració, i presentant un bon perfil de seguretat (Bainbridge, 2015; Buchlis, 2012; George, 2020; Testa, 2013). De totes maneres, el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica per al tractament de la malalties de Tay-Sachs i Sandhoff no era tant obvi, ja que diversos estudis destaquen la importància de tenir una proporció equimolar dels gens *HEXA* i *HEXB* per tal de poder aconseguir una correcta dimerització de la isoforma HEXA (Rastall, 2015; Woodley, 2018). Així doncs, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral va ser el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica *in vivo* per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff mitjançant una administració intra-LCR d'uns nous vectors AAV9 duals codificants pels gens *HexA* i *HexB* units per diferents *linkers* en els ratolins model de les malalties.

En primer lloc, com que es tractava d'uns models murins descrits prèviament i àmpliament utilitzats en altres estudis en el camp de la teràpia gènica, es va fer una

petita caracterització per comprovar que el fenotip descrit a la bibliografia es reproduís al nostre laboratori. En els dos models animals, es va observar que la reducció de l'expressió del gen mutat causant de la malaltia en els ratolins KO no era del 100%. En el murí de la malaltia de Tay-Sachs, la baixada estava al voltant del 90% en ambdós sexes i, en els ratolins Sandhoff, era propera al 60% en mascles i al 80% en el cas de les femelles. Aquest fet podria ser a causa de la transcripció del mRNA fins al punt d'inserció del casset d'expressió de la neomicina, utilitzat per a generar ambdós KO. En el ratolí model de Tay-Sachs, el gen *HexA* s'expressava fins a l'exó 8, mentre que en el de Sandhoff, fins a l'exó 13 del gen *HexB*. Tot i això, aquest mRNA truncat molt probablement era inestable, ja que produïa una proteïna no funcional, tal com es va comprovar amb l'anàlisi de les activitats β -hexosaminidasa. Les conseqüències del KO en el gen *HexA* i l'*HexB* van ser completament oposades, com estava descrit amb anterioritat. El model murí de Tay-Sachs és pràcticament asimptomàtic, per un mecanisme alternatiu de degradació del gangliòsid GM2 per l'acció combinada d'una sialidasa i la isoforma HEXB (Phaneuf, 1996). Per aquest motiu, no es van observar canvis en la supervivència entre els ratolins WT i els ratolins Tay-Sachs. En el cas del model de ratolí de la malaltia de Sandhoff, la disrupció del gen *HexB* si que va resultar en una disminució dràstica de l'esperança de vida al voltant dels 4,3 mesos als ratolins afectats, molt similar a la descrita prèviament en altres estudis (Lahey, 2020).

A diferència del model murí de la malaltia de Tay-Sachs, els ratolins Sandhoff recapitulaven les principals característiques de la malaltia humana (Sango, 1995). Així doncs, es va analitzar si a un mes d'edat els ratolins Sandhoff ja tenien establertes les alteracions patològiques característiques d'aquesta malaltia. El SNC, el teixit més afectat per la malaltia de Sandhoff, va mostrar l'acumulació primària del gangliòsid GM2 i secundària del colesterol no esterificat, que provocava una evident distensió lisosòmica, una alteració de l'homeòstasi del lisosoma i un augment de la neuroinflamació. Aquests resultats van demostrar que la patologia al SNC ja estava ben establerta a les edats més primerenques, fet que va resultar de molta utilitat per determinar que era un bon moment per a l'administració d'una nova estratègia de teràpia gènica i analitzar si es podia revertir aquesta patologia.

Tot i la gran quantitat d'estudis basats en el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, actualment no hi ha cap tractament capaç de contrarestar eficientment la patologia d'aquestes malalties. Per aquest motiu, era necessari trobar nous tractaments més òptims i eficaços, que permetin la reversió de les malalties.

Per aquest motiu, es va dissenyar una nova aproximació de teràpia gènica *in vivo* basada en l'ús d'uns nous vectors AAV duals, on cadascun d'ells codificava pels dos gens *HexA* i *HexB* units per un petit *linker* peptídic diferent (L1, L2 o L3). La utilització d'aquests vectors duals assegura l'expressió equimolar dels dos gens en totes les cèl·lules transduïdes. A més, tenir els dos gens units per un *linker* permetrien que tot l'enzim resultant de la traducció de l'mRNA sigui l'isoforma HEXA, l'única isoforma capaç de degradar GM2. Per tant, el desenvolupament d'aquests vectors duals, respecte a les estratègies terapèutiques basades en la co-administració de dos vectors diferents on cada un codifica un dels gens, permetria reduir la dosi necessària per aconseguir un efecte terapèutic, tot minimitzant els riscos de toxicitat associats a l'augment de la dosi (Ronzitti, 2020). A més, també facilitaria el procés de manufactura dels vectors AAV i en reduiria el seu cost, gràcies a la producció d'un únic vector dual.

Altres vectors bicistrònics descrits a la bibliografia també expressen els dos gens en el mateix constructe, però produeixen les dues subunitats (α i β) per separat, essent capaços de generar les tres isoformes HEXS ($\alpha\alpha$), HEXA ($\alpha\beta$) i HEXB ($\beta\beta$) (Lahey, 2020). Per tant, la producció de la isoforma HEXA està condicionada al procés de dimerització natural de les altres dues isoformes a les cèl·lules transduïdes. En canvi, els nostres constructes duals només produïen la isoforma HEXA, representant una millora en l'estratègia terapèutica, que *a priori* també permetria reduir la dosi administrada. Les tres β -hexosaminidases presenten unes especificitats de substrats molt àmplies i parcialment superposades (Sandhoff, 2013). Tant l'enzim HEXA com l'HEXB poden hidrolitzar la N-acetilhexosamina de glicoproteïnes, glicolípid, GAGs i oligosacàrids, mentre que l'HEXA és l'únic capaç de degradar el gangliòsid GM2, substrat que s'acumula a la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff (Boustany, 2013). També l'enzim HEXS és molt inestable i es troba en quantitats molt baixes en els individus sans (Mark, 2003). Així doncs una única administració dels vectors duals codificant per l'enzim HEXA seria suficient per tal de corregir les alteracions patològiques presentades per les dues malalties.

Per al disseny dels constructes duals, es van escollir tres *linkers* peptídics diferents. Els *linkers* són molt utilitzats per tal de generar proteïnes de fusió, agafant cada vegada més importància a la indústria farmacèutica pel lliurament de fàrmacs o bé per millorar el plegament o l'estabilitat d'aquestes proteïnes (Chen, 2013). De fet, diverses proteïnes de fusió s'han provat en diversos assajos clínics en humans (Somers, 2013; Strohl, 2015). La selecció d'un *linker* adequat per tal d'unir dos proteïnes és bastant complicada, la fusió directa de dominis funcionals sense un *linker* pot donar lloc a uns resultats no desitjats, com el plegament incorrecte de les proteïnes unides, un baix

rendiment en la producció d'aquestes o una activitat reduïda (Chen, 2013). A l'hora de dissenyar aquests *linkers*, hi ha diferents propietats que cal tenir en compte, com la llargada, la hidrofobicitat, la càrrega, la flexibilitat, la formació d'estructures secundàries, entre d'altres (Zhang, 2009).

Per tant, es van dissenyar tres *linkers* diferents, amb diferents propietats per a comprovar la seva funcionalitat en el constructe dual. En primer lloc, cal destacar que els tres *linkers* tenien llargades diferents: L1, 20 aa; L2, 33 aa i L3, 12 aa. En el cas del linker L1, estava format per una combinació de glicines i serines, residus molt flexibles i alhora hidròfils, que eviten la formació d'estructures secundàries i reduïa la probabilitat que els *linkers* interferissin amb el plegament proteic d'ambdós gens (van Rosmalen, 2017). El linker L2 també era flexible, més llarg i es tractava d'una combinació de diferents aminoàcids, utilitzats prèviament en el camp de la fusió de proteïnes en les tècniques de CRISPR-*prime editing* (Tong, 2021). Per últim, el linker L3 també s'havia utilitzat prèviament en el camp de les proteïnes de fusió (Waldo, 1999). De fet, es tractava d'un linker curt i flexible que utilitzava una combinació de glicines serines, alanines i treonines, que son aminoàcids poc voluminosos i no hidrofòbics. Pel disseny final dels constructes es va eliminar el pèptid senyal de localització del segon gen.

La transfecció amb cèl·lules HEK-293 amb els diferents constructes duals en els dos ordres possibles, *HexA-Linker-HexB* i *HexB-Linker-HexA*, va demostrar que només els constructes amb l'ordre *HexA-Linker-HexB* eren capaços de produir i secretar un enzim funcional. És possible que els constructes amb l'ordre *HexB-Linker-HexA* no permetessin un plegament correcte de la proteïna generada i, per tant, aquesta no fos activa en els extractes cel·lulars ni en el medi extracel·lular. Així doncs, es va decidir produir els tres vectors AAV9 amb l'ordre *HexA-Linker-HexB* per al desenvolupament pre-clínic d'una nova aproximació terapèutica per al tractament de les malalties de Sandhoff i Tay-Sachs.

Per tal d'aconseguir una àmplia distribució del vector viral al SNC, el teixit més afectat per les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff, es va optar per l'administració directament al LCR. Es tracta d'una via d'administració local dels vectors AAV amb un bon perfil de seguretat tant en pre-clínica com en clínica (Flotte, 2022; Meyer, 2015; Ribera, 2015). Per contra, també existeixen altres rutes d'administració alternatives, també utilitzades en les malalties amb una afectació principal del SNC, com la injecció intraparenquima o la intravenosa. Ara bé, l'administració intraparenquima es tracta d'un procediment més invasiu, que requereix una cirurgia esteriotàctica i múltiples injeccions directament al parenquima cerebral. A més, un dels principals inconvenients d'aquesta

via d'administració és la distribució més localitzada al punt d'injecció i per tant, una baixa distribució dels vectors virals, fent-la ideal per a les malalties que afecten a una regió definida del SNC, que no per les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff (Fajardo-Serrano, 2022; Haurigot, 2013a; Wang, 2019). En el cas de l'administració intravenosa, es necessita una dosi molt alta dels vectors AAV, que pot resultar en alguns efectes no desitjats, com la possibilitat de presentar toxicitat al fetge i presenta una transducció més limitada del SNC (Fajardo-Serrano, 2022). Per tant, l'administració intra-LCR ofereix més avantatges respecte aquestes altres dues rutes d'administració.

D'entre els diversos serotips d'AAV, es va escollir l'AAV9, gràcies a la seva àmplia distribució tant a l'encèfal com a la medul·la espinal. A més, actualment és un dels serotips més utilitzats en les aproximacions de teràpia gènica *in vivo* basades en l'ús d'AAV per a la transducció del SNC, ja que presenta un molt bon perfil de seguretat i una bona eficàcia terapèutica (Lykken, 2018; Ozlu, 2021). En anteriors aproximacions de teràpia gènica desenvolupades al nostre laboratori, s'havia demostrat que una única administració intra-LCR amb un vector AAV9, a través de la cisterna magna, permetia una distribució del vector per tot el SNC. A més, una part dels vectors AAV9 van passar a la circulació sanguínia, permetent també una eficient transducció del fetge. D'aquesta forma, es va aconseguir una recuperació de la patologia tant del SNC com dels teixits perifèrics característica de les diferents MPS estudiades (Haurigot, 2013b; Motas, 2016; Ribera, 2015; Roca, 2017).

Com que es volia aconseguir uns bons nivells d'expressió de l'enzim β -hexosaminidasa tant al SNC com als teixits i òrgans de la perifèria, es va seleccionar un promotor que permetia una expressió ubíqua del constructe, el Cbh, una versió més curta del promotor CAG que ha estat àmpliament utilitzat en el camp de la teràpia gènica (Gray, 2011). Finalment, tenint en compte que el model murí de la malaltia de Tay-Sachs era asimptomàtic (Phaneuf, 1996), l'avaluació de l'eficàcia terapèutica d'aquesta nova estratègia de teràpia gènica es va testar principalment en ratolins Sandhoff, que recapitulaven les principals característiques de la malaltia humana (Sango, 1995). Tal com es va evidenciar en l'estudi de fenotipatge, el model murí de Sandhoff ja tenia la patologia establerta al mes d'edat amb una greu afectació al SNC. Així doncs, als ratolins Sandhoff d'un mes d'edat se'ls va administrar directament al LCR els vectors duals AAV9 codificant pels dos gens (*HexA* i *HexB*) units per un *linker* per estudiar si era capaç de contrarestar la patologia de la malaltia.

Després de realitzar un primer estudi per tal de determinar el millor vector AAV9 dual per al tractament de la malaltia Sandhoff, es va poder demostrar una molt bona

eficàcia terapèutica per part de tots els vectors AAV9 duals. L'administració dels vectors AAV9-*HexA-L1-HexB* i AAV9-*HexA-L3-HexB* va resultar en uns nivells molt elevats d'activitat β -hexosaminidasa a l'encèfal, al fetge i al sèrum que van portar a una completa reversió de l'acumulació del gangliòsid GM2. En canvi, el vector AAV9-*HexA-L2-HexB* només va mostrar una correcció parcial de l'acumulació de GM2 al còrtex parietal, tot i els alts nivells d'activitat β -hexosaminidasa. Per tant, aquest va ser el motiu pel qual es va decidir no continuar amb l'avaluació de l'efecte terapèutic d'aquest vector.

A continuació, es va realitzar un estudi més exhaustiu per a l'avaluació de l'eficàcia terapèutica dels vectors AAV9 duals *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB* en la patologia del SNC i els teixits perifèrics del model murí de Sandhoff, després de l'administració intra-LCR a un mes d'edat. Aquesta vegada, com a animals control es van utilitzar els ratolins WT, els Sandhoff no tractats i injectats amb els vectors AAV9-*Null*. A més, també es van tractar ratolins Sandhoff amb els vectors AAV9 individuals (AAV9-*omHexA* i AAV9-*omHexB*) per tal d'estudiar si el disseny dels nous constructes duals podria presentar un benefici terapèutic superior. L'administració de vectors AAV9 individuals que codifiquen per separat els dos gens *HexA* i *HexB* és una aproximació terapèutica bastant utilitzada en el camp de la teràpia gènica per al tractament de les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff (Bradbury, 2013, 2015, 2017; Cachón-González, 2012, 2006, 2014; Gray-Edwards, 2015; McCurdy, 2015, 2021; Rockwell, 2015) Fins i tot, recentment s'ha iniciat un assaig clínic en humans amb aquesta aproximació basada en la combinació de l'administració directament al LCR i al tàlem. Els dos primers pacients de Tay-Sachs van presentar un lleuger augment de l'activitat HEXA al SNC, juntament amb una bona seguretat a temps curts post-tractament (Flotte, 2022).

Tant l'administració dels vectors AAV9 duals com els individuals va resultar amb un augment de les activitats β -HEXO i HEXA a l'encèfal, al fetge i al sèrum. Contràriament al que es va observar als vectors AAV9 duals, els vectors AAV9 individuals van presentar un augment molt més elevat de l'activitat β -HEXO, en comparació a l'HEXA. L'activitat β -HEXO et permet mesurar l'activitat de les tres isoformes (HEXA, HEXB i HEXS), mentre que l'activitat HEXA (HEXA i HEXS) és la més específica de la isoforma capaç de degradar el gangliòsid GM2. Aquesta diferència en les activitats podria explicar-se pel fet que la co-administració per separat dels dos gens permet la dimerització de les tres isoformes que resulta en una activitat β -HEXO més elevada. Per contra, els vectors duals, com que els gens estan units per un *linker*, sempre produïen la isoforma HEXA, l'única capaç de degradar GM2, resultant en un augment més destacat de l'activitat HEXA. Aquests resultats demostren que la nostra aproximació representa una millora estratègica en la degradació del gangliòsid GM2 i,

conseqüentment, en la reversió de les alteracions patològiques de la malaltia, davant d'altres aproximacions que permetin la generació de les tres isoformes.

Una altra diferència remarcable entre els vectors AAV9 individuals i duals és la distribució de la proteïna a l'encèfal. L'administració dels vectors duals va resultar en una àmplia i homogènia distribució a tot l'encèfal, determinada a través de l'anàlisi de les activitats β -hexosaminidasa. Per altra banda, els vectors individuals presentaven molt poca activitat, sobretot a l'activitat HEXA, en regions llunyanes al punt d'injecció, que pràcticament eren similar als nivells dels ratolins Sandhoff no tractats o injectats amb el vector *Null*. Aquesta distribució més heterogènia podria ser per la necessitat de co-transducció a nivells equimolars per part dels dos vectors AAV9 individuals a la mateixa cèl·lula, que podria esdevenir més complicat a mesura que t'allunyes del punt d'injecció.

L'augment de l'activitat va resultar en una reversió de l'acumulació del gangliòsid GM2 a tot l'encèfal per part dels vectors AAV9 duals, mentre que amb els vectors AAV9 individuals només es va observar una correcció parcial en algunes regions on es va detectar alguna cèl·lula amb acumulacions del gangliòsid GM2. Altres grups també han analitzat l'acumulació del GM2 als 4 mesos d'edat, com es el cas d'un estudi amb ratolins Sandhoff administrats de forma intravenosa a neonats amb un vector AAV codificant únicament pel gen *HexB* a una dosi de $3,5 \times 10^{13}$ vg/kg, van aconseguir només una reducció parcial de l'acumulació de GM2, en el cervell i el cerebel (Niemir, 2018). En el cas dels vectors bicistrònics, un estudi on injecten un constructe bicistrònic utilitzant el P2A, un element que pot induir el salt del ribosoma durant la traducció de la proteïna, administren el vector de forma intravenosa a una dosi de $2,04 \times 10^{10}$ vg a ratolins nounats. Als 4 mesos d'edat també resulta en només una reducció parcial del gangliòsid GM2 en diferents zones de l'encèfal (Woodley, 2018). En el cas de la proteïna quimèrica HEXM, que també va ser administrada de forma intravenosa a ratolins Sandhoff nounats, també aconseguen simplement una reducció parcial del gangliòsid GM2 (Tropak, 2016). Fins i tot, una altra estratègia més innovadora basada en la integració del cDNA de *l'HexM* en el *locus* de l'albúmina mitjançant CRISPR en ratolins Sandhoff nounats, no van aconseguir cap reducció de l'acumulació del gangliòsid GM2 al cervell (Ou, 2020). Malgrat que moltes d'aquestes aproximacions administraven els vectors abans de l'inici de l'acumulació del gangliòsid GM2 (ratolins nounats), els vectors AAV9 duals presentaven eficàcia terapèutica superior en la reversió total de l'acumulació primària del gangliòsid GM2, després de l'administració dels vectors en ratolins d'un més d'edat amb la malaltia ja establerta.

En la malaltia de Sandhoff es va detectar que una acumulació primària del gangliòsid GM2, resultava en una acumulació secundària del colesterol no esterificat (Walkley, 2009), que ja era present en aquests ratolins a 1 mes d'edat. L'administració dels vectors duals va resultar en una reversió total d'aquesta acumulació, mentre que els vectors AAV9 individuals van donar lloc a una reducció parcial al cerebel, indicant una limitada eficàcia en l'eliminació d'aquest substrat secundari.

La reversió de l'acumulació primària del gangliòsid GM2 i secundària del colesterol no esterificat als lisosomes del SNC aconseguida gràcies a l'administració dels vectors AAV9 duals també va permetre restaurar l'homeòstasi lisosòmica, una alteració patològica molt característica de les LSD (Ferreira, 2017). En moltes LSD, com a conseqüència de la pèrdua de l'homeòstasi dels lisosomes i la disfunció de les capacitats hidrolítiques dels enzims, hi ha un bloqueig del flux autofàgic (Seranova, 2017; Zhang, 2021), per la possible manca de capacitat del lisosoma per a fusionar-se correctament amb els autofagosomes (Settembre, 2008). Així doncs, una pèrdua de la capacitat autofàgica al SNC també està involucrada en la neurodegeneració en ratolins (Komatsu, 2006). A més a més, aquest conjunt de substrats tòxics acumulats a l'interior de les cèl·lules són possibles mediadors de la mort cel·lular (Settembre, 2008; Zhang, 2021). Ara bé, l'administració intra-LCR dels vectors AAV9, tant els duals com els individuals, va aconseguir la recuperació del flux autofàgic a l'encèfal, indicant una millora d'un paràmetre directament involucrat en els processos neurodegeneratius.

Moltes de les LSD amb patologia al SNC es caracteritzen pel desenvolupament d'una severa neuroinflamació, que pot afectar negativament a la supervivència neuronal amb una clara afectació a la progressió de la neurodegeneració. Majoritàriament, aquesta neuroinflamació es presenta com una activació tant de la micròglia com dels astròcits (Bosch, 2015). Tant l'activació de la micròglia com l'astrocitosi participen en la regulació de les respostes inflamatòries a través de l'alliberació de factors pro-inflamatoris com les citocines (Ogawa, 2017; Wada, 2000, 2001). L'autofàgia en cèl·lules sanes té un efecte antiinflamatori important, però un defecte en el flux autofàgic activa la inflamació (Simonaro, 2019). El model de Sandhoff a un mes d'edat ja presentava un augment dels astròcits a l'encèfal, i a 4 mesos d'edat ja mostrava una evident neuroinflamació generalitzada, amb una marcada microgliosi i astrocitosi i una alteració del perfil de citocines a l'encèfal d'aquests ratolins. En pacients afectats per la forma infantil de la malaltia de Tay-Sachs i Sandhoff, es va detectar una elevació persistent al LCR d'algunes citocines inflamatòries, com el , CCL4, TNF α i Mcp1, que també estaven alterades al model murí de Sandhoff (Hayase, 2010; Utz, 2015). L'administració intra-LCR tant dels vectors AAV9 duals com els individuals va resultar en una correcció

generalitzada de la neuroinflamació i una normalització del perfil de citocines. Així doncs, algunes d'aquestes citocines podrien ser uns bon candidats com a biomarcadors al LCR, que es podrien utilitzar per a dur a terme el seguiment de l'eficàcia terapèutica del tractament en un futur assaig clínic en humans.

El colesterol influeix en molts passos del procés de mielinització, des de la diferenciació de les cèl·lules glials mielinitzants durant el procés de biogènesi de la membrana de mielina, fins a la funcionalitat de la mielina madura. El colesterol es considera l'únic component integral de la mielina que és essencial i limita la velocitat de desenvolupament de la mielina al SNC i perifèric (Saher, 2010, 2015, 2011). A més, també s'ha descrit que és necessari pel transport i la incorporació de proteïnes estructurals de la mielina, com seria la PLP1 (Saher, 2015; Simons, 2000). Fins i tot, s'ha descrit la relació d'algunes citocines, com el MCP1 o el CCL3, en el desenvolupament de la desmielinització inflamatòria (Banisor, 2005). En pacients humans de Tay-Sachs i Sandhoff, també s'ha observat que presenten problemes de mielinització (Alkan, 2003; Aydin, 2005). Més concretament en el cas de la malaltia de Sandhoff, hi ha una reducció dels lípids enriquits amb mielina, com els cerebròsids i els sulfàtids, tant als ratolins model de la malaltia com als pacients humans (Baek, 2009; Cachón-González, 2014). Aquests processos de desmielinització es creu que contribueixen en el progrés de la malaltia (Baek, 2009; Cachón-González, 2014). Després de detectar l'alteració del perfil de citocines, com la MCP1 o el CCL3 en el model murí de Sandhoff, també es van observar una evident alteració de la mielinització als 4 mesos d'edat, tant al cervell com a la medul·la espinal, que es van poder revertir amb l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals i individuals.

Malgrat que les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff tenen una afectació principal al SNC, la malaltia de Sandhoff també presenta una afectació més lleu als teixits perifèrics (Cachon-Gonzalez, 2018). Per tant, la transducció del fetge, a través d'una única administració intra-LCR, presenta una gran avantatge per al tractament d'aquesta patologia. D'aquesta manera, part del vector drena des del LCR cap a circulació perifèrica, fet que permet la transducció del fetge. Aleshores, aquest òrgan és capaç de secretar l'enzim HEXA al sistema circulatori, tal com es va observar a les activitats β -hexosaminidasa al sèrum. Aquest fet va permetre que la proteïna activa arribés a altres òrgans no transduïts, aconseguint una reversió de la patologia perifèrica. Tant l'anàlisi de l'activitat al fetge i al sèrum dels ratolins Sandhoff com Tay-Sachs va resultar en un augment superior en mascles, en comparació amb les femelles. Uns resultats molt semblants ja s'havien obtingut en altres estudis, que demostraven que la transducció del fetge dels ratolins mascles era més eficient per part dels vectors AAV que en les

femelles (Davidoff et al., 2003; Ruzo et al., 2012). Aquestes dades no es van reproduir en els fetges dels primats no humans després de l'administració de vectors AAV (Binny, 2012), suggerint que les pacients probablement no presentarien aquesta desavantatge detectada en ratolins. L'increment de l'activitat hepàtica i circulatòria, després de l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals i individuals, va permetre la correcció de l'acumulació de GAGs al fetge, la melsa i el ronyó. Comparativament, els gats Sandhoff d'un mes d'edat, tractats amb una administració bilateral al tàlem i una intracerebroventricular dels vectors individuals AAVrh8 a una ratio equimolar 1:1 de la subunitat α i β va, conduir a una reducció parcial dels GAGs a fetge, sense observar cap millora significativa en el contingut de GAGs a melsa i ronyó. A més, la nostra via d'administració utilitzant el vector AAV9 no només va resultar en un millor benefici terapèutic, sinó que també va comportar la normalització de l'acumulació de colesterol i la recuperació de l'homeòstasi del lisosoma al fetge (Gray-Edwards, 2015).

Les malalties de Tay-Sachs i Sandhoff també es caracteritzen per una debilitat progressiva, pèrdua de motricitat i rigidesa fins a arribar a un estat vegetatiu (Maegawa, 2006; Pampiglione, 2008). Conseqüentment, les millores funcionals són molt importants a l'hora de desenvolupar un tractament per tal de millorar la qualitat de vida dels pacients. Als 4 mesos d'edat, l'administració dels vectors AAV9, tant els duals com els individuals, va permetre la normalització de l'activitat locomotora, la coordinació, la força muscular i la mobilitat. Si s'analitzen els problemes de coordinació en un període d'un any, es va observar que els ratolins administrats amb els vectors AAV9 duals eren capaços de mantenir una molt bona coordinació motora fins un any després del tractament. En canvi, els animals tractats amb els vectors AAV9 individuals, van presentar una pèrdua de coordinació motora a partir dels 5 mesos acompanyada d'un augment de la mortalitat. Els resultats obtinguts 3 mesos després del tractament indiquen que l'administració dels vectors duals i individuals mostren una correcció similar de les alteracions patològiques de la malaltia. Ara bé, a llarg termini, els vectors AAV9 duals presenten un benefici terapèutic clarament superior. Aquest fet podria ser a causa de la diferència d'activitat HEXA, més específica de la isoforma HEXA, a l'encèfal entre ambdós vectors (duals i individuals). Durant els primers mesos de vida, uns nivells baixos d'activitat HEXA podrien ser suficient per millorar les principals alteracions patològiques de la malaltia, però a una edat més avançada caldria una aportació constant i elevada d'HEXA per mantenir la correcció funcional.

L'estudi de la supervivència també dona suport a la idea que els vectors AAV9 duals presenten un efecte terapèutic superior a més llarg termini. Els ratolins Sandhoff administrats amb els vectors AAV9 duals *HexA-L1-HexB* i *HexA-L3-HexB* presentaven

una supervivència mediana molt superior als animals Sandhoff no tractats, allargant la vida mediana fins a casi dos anys de vida, mentre els ratolins no tractats tenien una mediana de 4,5 mesos. En el cas dels vectors AAV9 individuals l'esperança de vida era molt més curta. La producció de l'heterodímer HEXA unit covalentment permet una millora significativa a llarg termini, en comparació als vectors AAV9 individuals.

Si es compara el tractament desenvolupat en aquest treball amb d'altres publicats prèviament, també s'observa un benefici terapèutic superior en la supervivència. Als estudis on administren un vector rAAV monocistrònic codificant pel gen *HexB* als ratolins Sandhoff tractats per via intravenosa a 1-2 dies d'edat a una dosi de $2,5 \times 10^{14}$ vg/kg viuen més de 10 mesos de mediana, on eutanasiaven els animals, mentre que els animals Sandhoff que rebien una dosi de $3,5 \times 10^{13}$ vg/kg per via intravenosa als 1,5 mesos d'edat, tenien una mediana de supervivència molt similar als ratolins no tractats de 4,75 mesos (Walia, 2015). A més, també van observar que 8/10 ratolins Sandhoff administrats de forma intravenosa quan eren nounats van desenvolupar tumors al fetge (Walia et al., 2015), indicant que només eren capaços de prevenir la malaltia, i no de revertir-la, i confirmant que l'administració d'altres dosis de forma sistèmica pot provocar hepatocarcinomes. Altres estudis també han observat toxicitat associada a altres dosis administrades de forma intravenosa (Hinderer, 2018) i, en alguns casos, el desenvolupament d'hepatocarcinomes sobretot administrant els vectors a ratolins nounats (Donsante, 2007; Sabatino, 2022; Sands, 2012). Un altre grup de recerca va allargar la vida dels ratolins Sandhoff fins a una mediana de 24 mesos, després d'una administració intravenosa d'un vector AAV9 codificant pel gen *HexB* a una dosi de $3,5 \times 10^{13}$ vg/kg a animals nounats (Niemi, 2018). Aquest estudi només demostra la prevenció de la malaltia i, altra vegada, utilitzant una dosi molt alta intravenosa amb els riscs associats que pot comportar. Finalment, un estudi en que es va utilitzar la proteïna quimèrica HEXM, una nova variant de l'heterodímer HEXA humana que incorpora seqüències crítiques tant de la subunitat α com la β , van administrar amb un vector AAV9.47 el gen *HexM*, per via intravenosa a una dosi de 5×10^{10} vg/animal a ratolins Sandhoff nounats i van observar només una supervivència mediana de 10 mesos d'edat (Osmon, 2016).

En el cas de la co-administració dels vectors monocistrònics que codifiquen pels gens *HexA* i *HexB*, s'ha observat la necessitat de múltiples administracions al parènquima cerebral per tal d'assolir un augment significatiu de la supervivència dels ratolins Sandhoff tractats (Cachón-González, 2012). De fet, una única administració dels dos vectors a l'estriat només aconsegueixen una mediana de supervivència de 6,75 mesos, mentre que amb tres administracions, dues de forma bilateral a l'estriat i una al

cerebel, arriben a una mediana de supervivència de 22 mesos d'edat, tot i que no mencionen la dosi administrada (Cachón-González, 2012). Ara bé, els assajos clínics basats en l'administració intraparenquima dels vectors AAV han necessitat de múltiples administracions a causa de la mida de l'encèfal humà i la poca distribució dels vectors assolida per aquest tipus d'administració (Haurigot, 2013a). En concret, en un estudi clínic en pacients MPSIIIA es van realitzar 12 administracions diferents (Tardieu et al., 2014), mentre que en un altre amb pacients MPSIIIB se'n van realitzar 16 (Tardieu, 2017) i els resultats d'aquests assajos no van ser molt prometedors.

Aquesta mateixa aproximació també es va provar amb animals més grans afectats per la malaltia, com el model felí de Sandhoff. Amb dues administracions al tàlem a una dosi de $3,2 \times 10^{12}$ vg/animal en una fase presimptomàtica van aconseguir un augment de la supervivència de 2,3 vegades respecte als gats no tractats (Bradbury, 2013). Un altre estudi, després d'una triple administració, dos injeccions bilaterals al tàlem i una al cerebel a una dosi de $4,4 \times 10^{12}$ vg/animal, només van aconseguir un augment de 3 vegades en l'esperança de vida dels gats tractats a una fase primerenca de la malaltia, i no van observar cap canvi en la supervivència tractant els animals quan la malaltia ja estava establerta (McCurdy, 2021). En conjunt, aquests estudis demostren la necessitat d'utilitzar nombroses administracions intraparenquima per tal d'assolir una millora significativa en la supervivència gràcies a la teràpia.

A més, s'ha realitzat un estudi toxicològic amb aquesta mateixa aproximació basada en múltiples injeccions intraparenquima en *Cynomolgus macaques* sans, els quals es va administrar tres dosis diferents ($3,2 \times 10^{12}$ vg, $3,2 \times 10^{11}$ vg i $1,1 \times 10^{11}$ vg) utilitzant dos vectors AAVrh8 monocistrònics (*HexA* i *HexB*) (Golebiowski, 2017). La majoria d'animals van desenvolupar discinèsies, atàxia i pèrdua de destresa, i l'histopatologia va revelar una necrosis severa de la substància blanca i grisa al voltant dels punts d'injecció. Malgrat la pèrdua cel·lular, es va detectar un augment de l'activitat HEXA al tàlem i no es van detectar anticossos contra l'enzim, per tant, la toxicitat podria ser causada pel volum injectat en les administracions intraparenquima (Golebiowski, 2017).

Els vectors bicistrònics també presenten l'avantatge d'administrar ambdós gens, *HexA* i *HexB*, en un sol vector viral AAV. Tot i això, un estudi on utilitzen un vector AAV9 bicistrònic amb l'element P2A administrat per via sistèmica a una dosi de $2,04 \times 10^{13}$ vg/kg a ratolins Sandhoff nounats només aconsegueix una supervivència mediana de 6 mesos (Woodley, 2018). En un altre estudi, on injecten uns constructes bicistrònics, amb l'element P2A o amb un promotor BiCBA que codifiquen pels dos gens simultàniament

en un únic vector AAV (PHP.B o AAV9). Després de l'administració intravenosa a una dosi alta de 1×10^{12} vg/animal, aconseguen una supervivència mediana del voltant dels 20 mesos d'edat, tot i que quan injecten una dosi 1×10^{11} vg/animal, la dosi utilitzada als nostres estudis, no observen cap augment en la supervivència respecte els animals malalts (Lahey, 2020). A més a més, també s'ha descrit que l'eficàcia de travessar la BHE per part del vector PHP.B només s'ha observat en ratolins de la soca C57B6, per tant, aquest serotip no seria una bona elecció per traslladar aquesta tractament a la clínica humana (Fajardo-Serrano, 2022). Tot i això, aquestes aproximacions de teràpia gènica segueixen presentant un alt risc de desenvolupar un hepatocarcinoma, a causa de les dosis altes administrades intravascularment (Sabatino, 2022). Tenint en compte que són malalties que clarament tenen una afectació més severa al SNC, una administració local que et permeti disminuir la dosi, aconseguint també una millor, àmplia i homogènia distribució al SNC presenta una millora estratègica de la teràpia, tal com han demostrat els nostres vectors AAV9 duals després d'una administració intra-LCR.

En resum, la majoria d'aproximacions de teràpia gènica *in vivo* que s'han publicat prèviament presentaven certes desavantatges/inconvenients. (1) En general, es basen en el tractament dels animals de forma pre-sintomàtica al voltant dels 1-2 dies d'edat, que únicament permet assolir una prevenció de la malaltia. (2) Aquestes estratègies terapèutiques solen utilitzar l'administració intravenosa, que requereix l'ús d'unes dosis superiors en comparació amb una administració més local com la intra-LCR. A més, alguns estudis han demostrat determinats riscos i toxicitats associades a aquestes altes dosis de vectors AAV per via sistèmica, com una possible associació amb el desenvolupament d'hepatocarcinomes sobretot en dosis molt altes, (3) Finalment, algunes d'aquestes aproximacions es basen en l'administració local intraparènquima, molt invasiva, que requereix múltiples injeccions per tal d'aconseguir una bona eficàcia terapèutica. Recentment, un estudi pre-clínic realitzat en primats no humans ha demostrat toxicitat associada a l'administració intraparènquima, resultant amb una necrosi i mort cel·lular en el teixit pròxim als punts d'injecció (Golebiowski, 2017).

En conclusió, els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, després d'una única administració intra-LCR, a una dosi d' 1×10^{11} vg/animal i a una edat quan la malaltia ja estava establerta, demostren una molt bona eficàcia terapèutica amb la reversió de la patologia al SNC i la correcció de les alteracions als teixits perifèrics, que va resultar en una correcció del comportament i un augment significatiu de la supervivència. Així doncs, aquests resultats evidencien el gran potencial terapèutic d'aquesta nova aproximació de teràpia gènica *in vivo*, generant una base sòlida per a la possible

translació d'aquesta estratègia terapèutica a la clínica per al tractament dels pacients tant de la malaltia de Sandhoff com de Tay-Sachs.

VI. CONCLUSIONS

1. El model murí de la malaltia de Sandhoff a un mes d'edat presentava la malaltia ja establerta. En canvi, el ratolí model de Tay-Sachs, tal com ja s'havia descrit, no desenvolupava cap símptoma de la malaltia.
2. Es va dissenyar una nova estratègia de teràpia gènica per a Tay-Sachs i Sandhoff basada l'administració d'uns nous vectors AAV9 duals que codificaven cadascun d'ells pels dos gens *HexA* i *HexB* units amb un peptid *linker* diferent (L1, L2 i L3).
3. Es va observar que únicament els constructes amb l'ordre *HexA-Linker-HexB* eren capaços de generar la isoforma activa de l'enzim HEXA i que se secretava fora la cèl·lula. Estudis *in vivo* van revelar que els vectors AAV9-*HexA-L1-HexB* i AAV9-*HexA-L3-HexB* eren més eficients que el AAV9-*HexA-L2-HexB*.
4. L'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de la malaltia de Sandhoff va resultar en un augment d'activitat β -hexosaminidasa en totes les regions de l'encèfal, que va revertir l'acumulació primària del gangliòsid GM2 i secundària del colesterol no esterificat.
5. La reversió de les acumulacions lisosòmiques al SNC va permetre contrarestar també els problemes en l'homeòstasi als lisosomes, la neuroinflamació i va normalitzar l'autofàgia i la mielinització.
6. Els vectors AAV9 duals administrats intra-LCR en els ratolins Sandhoff, van passar a la circulació sanguínia i van transduir el fetge. Aquest òrgan va secretar l'enzim HEXA al torrent sanguini. D'aquesta manera es va corregir l'acumulació secundària de GAGs i colesterol total i l'homeòstasi lisosòmica a tots els teixits perifèrics.
7. La correcció de la patologia al SNC i als teixits perifèrics assolida després de l'administració dels vectors AAV9 duals, va permetre normalitzar els dèficits motors presents en el ratolins Sandhoff, com l'activitat motora, la coordinació, la força muscular i la mobilitat. També va resultar en un gran increment de la supervivència dels ratolins tractats.

8. L'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals al model murí de Tay-Sachs també va permetre un augment de l'activitat β -hexosaminidasa al SNC, al fetge i al sèrum, resultats que suggerien que aquesta teràpia gènica també podria revertir la malaltia en pacients humans.
9. En resum, els resultats obtinguts en aquesta tesi permeten establir les bases per la translació clínica de l'estratègia de teràpia gènica basada en l'administració intra-LCR dels vectors AAV9 duals per al tractament de les malalties de Sandhoff i Tay-Sachs.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals

El ratolí C57B129SF2/J deficient pel gen *HexB* (Sandhoff), el qual tenia una inserció del casset d'expressió del gen de resistència a la neomicina a l'exó 13 del gen *HexB* (Sango et al., 1995), es va adquirir a *The Jackson Laboratory*. Per altra banda, el ratolí C57B129SF2/J deficient pel gen *HexA* (Tay-Sachs), el qual també tenia una inserció del casset d'expressió del gen de resistència a la neomicina en aquest cas a l'exó 8 del gen *HexA* (Yamanaka et al., 1994), també es va adquirir a *The Jackson Laboratory*.

Les colònies de Sandhoff i Tay-Sachs es van establir a partir dels ratolins vius que es van adquirir a *The Jackson Laboratory*. En ambdós casos, es va establir i mantenir la colònia mitjançant el creuament de ratolins heterozigots per a la mutació.

Els ratolins es van mantenir a les instal·lacions del Servei d'Establulació de Ratolins del CBATEG, en condicions lliures de patògens específics (*specific-pathogen-free*, SPF) i amb una temperatura de 22 ± 2 °C i il·luminació controlades (cicles de llum i foscor de 12 h, on s'obrien els llums a les 8 h del matí). Els animals estaven alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard (Teklad Global 18% protein rodent diet, 2018S; Harlan Labs).

Tots els procediments experimentals i de benestar animal van ser prèviament avaluats, aprovats i autoritzats per la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la UAB.

1.2. Soques bacterianes

Per a la generació dels constructes utilitzats a aquesta tesi doctoral, es van fer servir les soques d'*E. coli* Stbl3 i Dh5 α (Thermo Fisher Scientific) i XL2-Blue (Agilent Technologies). Per a la seva selecció, els plasmidis contenien un gen de resistència a l'ampicil·lina o a la kanamicina, que permetien el seu creixement en medi LB (Conda) suplementat amb 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicil·lina o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Quan es requeria el creixement dels cultius en medi sòlid, es va afegir un 2% d'agar al medi.

1.3. Anticossos

Els anticossos detallats a la Taula 6 i la Taula 7 es van fer servir per a la detecció de proteïnes mitjançant les anàlisis immunohistoquímiques i els *Western blots*, respectivament.

Taula 6. Llista d'anticossos utilitzats a les immunohistoquímiques.

Immunohistoquímica				
Anticòs	Hoste	Proveïdor	Referència	Dilució
<i>Anticossos primaris</i>				
Anti-LIMP2	Conill	Novus Biologicals	NB400-129	1/100
Anti-GFAP	Conill	Dako	Z0334	1/1000
Anti-GM2	Mouse	Amsbio	AMS.A2576	1/300
<i>Anticossos secundaris</i>				
Anti-Rabbit IgG biotinilated	Cabra	ThermoFisher	31820	1/300
Anti-Mouse IgG biotinilated	Cavall	Vector Labs	BA-2000	1/300

Taula 7. Llista d'anticossos utilitzats als *Western blot*.

Western blot				
Anticòs	Hoste	Proveïdor	Referència	Dilució
<i>Anticossos primaris</i>				
Anti-LC3B	Conill	Novus Biologicals	NB100-2220	1/2000
Anti- α Tubulina	Conill	Abcam	Ab4074	1/2000
<i>Anticossos secundaris</i>				
Anti-Rabbit IgG HRP conjugate	Porc	Dako	P0217	1/20000

1.4. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en la present tesi doctoral per a la producció dels vectors virals AAV es detallen a la Taula 8.

Taula 8. Llista de plasmidis.

Plasmidi	Promotor	Insert	Senyal de poliadenilació
pAAV-Cbh	Cbh	-	SV40
pomHexA	-	HexA de ratolí optimitzada	-
pomHexB	-	HexB de ratolí optimitzada	-
pAAV-Cbh-omHexA	Cbh	HexA de ratolí optimitzada	SV40
pAAV-Cbh-omHexA	Cbh	HexB de ratolí optimitzada	SV40
pAAV-Cbh-omHexA-P2A-omHexB	-	HexA i HexB de ratolí optimitzades unides amb l'element P2A	SV40
pAAV-Cbh-omHexB-P2A-omHexA	-	HexA i HexB de ratolí optimitzades unides amb l'element P2A	SV40
pAL1B	-	Fragment 5' del gen HexA + seqüència del linker L1 + fragment 3' del gen HexB	-
pAL2B	-	Fragment 5' del gen HexA + seqüència del linker L2 + fragment 3' del gen HexB	-
pAL3B	-	Fragment 5' del gen HexA + seqüència del linker L3 + fragment 3' del gen HexB	-
pBL1A	-	Fragment 3' del gen HexA + seqüència del linker L1 + fragment 5' del gen HexB	-
pBL2A	-	Fragment 3' del gen HexA + seqüència del linker L2 + fragment 5' del gen HexB	-
pBL3A	-	Fragment 3' del gen HexA + seqüència del linker L3 + fragment 5' del gen HexB	-
pAAV-Cbh-omHexA-L1-omHexB	Cbh	HexA i HexB de ratolí optimitzades unides amb el linker 1	SV40
pAAV-Cbh-omHexA-L2-omHexB	Cbh	HexA i HexB de ratolí optimitzades unides amb el linker 2	SV40
pAAV-Cbh-omHexA-L3-omHexB	Cbh	HexA i HexB de ratolí optimitzades unides amb el linker 3	SV40
pAAV-Cbh-omHexB-L1-omHexA	Cbh	HexB i HexA de ratolí optimitzades unides amb el linker 1	SV40
pAAV-Cbh-omHexB-L2-omHexA	Cbh	HexB i HexA de ratolí optimitzades unides amb el linker 2	SV40
pAAV-Cbh-omHexB-L3-omHexA	Cbh	HexB i HexA de ratolí optimitzades unides amb el linker 3	SV40

El plasmidi pAAV-Cbh conté les seqüències ITR, que són necessàries per l'encapsidació dels vectors AAV, el promotor Cbh i la senyal de poliadenilació (poliA) SV40. El promotor Cbh és una nova versió truncada del promotor CBA, format pel potenciador de la transcripció del citomegalovirus humà (CMV), el promotor de la β -actina de pollastre i un intró híbrid compost de la regió 5' del lloc d'unió del donador de *splicing* del gen de la β -actina de pollastre i la regió 3' del lloc d'unió de l'acceptor de *splicing* del virus *minute* del ratolí (VMR). Aquest promotor permet que els gens d'interès s'expressin de forma ubiqua i robusta (Gray, 2011).

Els plasmidis pom*HexA* i pom*HexB* (GeneArt: Life Technologies) contenen les seqüències murines optimitzades dels gens *HexA* i *HexB*, les quals es van optimitzar mitjançant un algorisme comercial per augmentar la transcripció i l'estabilitat del mRNA i la traducció proteica. L'algorisme té en compte diversos paràmetres com el contingut de CG, l'ús de codó, possibles estructures secundàries, entre d'altres paràmetres. Per tal de generar els plasmidis pAAV-Cbh-om*HexA* i pAAV-Cbh-om*HexB*, es van clonar els gens optimitzats *HexA* i *HexB* dels plasmidis pom*HexA* i pom*HexB* al plasmidi pAAV-Cbh amb els enzims de restricció NheI i BamHI.

Per a la generació dels constructes duals, es van utilitzar dos vectors clonats prèviament al nostre laboratori, el pAAV-Cbh-om*HexA*-P2A-om*HexB* i el pAAV-Cbh-om*HexB*-P2A-om*HexA*. Per tal d'obtenir els plasmidis pAAV-Cbh-om*HexA*-*Linker*-om*HexB*, el plasmidi pAAV-Cbh-om*HexA*-P2A-om*HexB* es va tallar amb els enzims AfeI-BbvCI i s'hi va introduir l'insert, que contenia primer un fragment 5' del gen *HexA* unit amb un *linker* (L1, L2 o L3) a un fragment 3' del gen *HexB*, provinents dels plasmidis pAL1B, pAL2B i pAL3B tallats amb AfeI-BbvCI. Per altra banda, es va realitzar el mateix procediment per tal d'obtenir els plasmidis amb l'ordre invers pAAV-Cbh-om*HexB*-*Linker*-om*HexA*. En aquest cas, el plasmidi pAAV-Cbh-om*HexB*-P2A-om*HexA* es va tallar amb els enzims AfeI+AvrII i s'hi va introduir l'insert, que contenia primer un fragment 5' del gen *HexB* unit amb un *linker* (L1, L2 o L3) a un fragment 3' del gen *HexA*, provinents dels plasmidis pBL1A, pBL2A i pBL3A tallats amb AfeI-BbvCI.

1.5. Reactius

Tots els reactius de biologia molecular utilitzats en el desenvolupament de la present tesis doctoral ses van obtenir a partir dels següents fabricants comercials: Abcam (Cambridge, Regne Unit), DakoCytomation (Glostrup, Dinamarca), Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Moscerdam Substrates (Holanda), Carbosynth Ltd (Compton, Regne Unit), Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadà), Enantia (Barcelona, Espanya), Panreac (Barcelona, Espanya), Amsbio (Regne Unit), Promega Corporation (Madison, WI, EUA), Qiagen (Hilden, Alemanya), New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA), Roche (Basilea, Suïssa), Fermentas (St. Leon-Rot, Alemanya), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), Stratagene-Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanya), Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), Vector Laboratories Ltd. (Burlingame, CA, EUA), Millipore (Burlington, MA, EUA), Novus Biologicals (Littleton, CO, EUA), iNtRON Biotechnology (Sangdaewon, Corea del Sud), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Àustria), Hamilton Company (Reno, NV, EUA), B. Braun (Melsungen, Alemanya), Philips (Amsterdam, Païssos Baixos), Carbosynth (Thal, Suïssa), Horiba (Kyoto, Japó).

2. MÈTODES

2.1. Genotipatge dels ratolins Sandhoff i Tay-Sachs

El genotipatge dels ratolins Sandhoff i Tay-Sachs es va dur a terme amb el DNA genòmic obtingut d'un tall de la cua de l'animal i el posterior anàlisi per PCR per tal de detectar la presència de la casset d'expressió del gen de resistència a la neomicina.

2.1.1. Aïllament del DNA genòmic

El DNA genòmic es va extreure de les mostres de cua, d'aproximadament uns 0,5 cm de longitud, de ratolins al voltant de les 3 setmanes d'edat. Les mostres es incubar durant 30 minuts a 95°C en 100 µl de tampó de lisi (25 mM NaOH, 0.2 mM Na₂EDTA, pH 12). Seguidament, es van refredar les mostres durant 2 minuts amb gel i es va aturar la reacció de lisi amb l'addició de 100 µl de tampó de neutralització (40 mM Tris-HCL, pH 5).

2.1.2. Genotipatge per PCR

2.1.2.1. Colònia de ratolins Sandhoff

L'estratègia de genotipatge es va dissenyar per tal de poder diferenciar entre l'al·lel WT i el mutat; d'aquesta forma, es tenia la capacitat de saber si els animals eren WT, heterozigots o Sandhoff. El genotipatge consistia en l'ús d'un oligonucleòtid capaç de reconèixer les zones comunes entre els dos al·lells (*Forward* comú) i dos altres oligonucleòtids més que reconeixien una zona específica de cada al·lel, el *Reverse* WT reconeix l'al·lel WT i el *Reverse* KO reconeix el mutat.

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats van ser:

<i>Forward</i> comú:	5' – ATT TTA AAA TTC AGG CCT CGA – 3'
<i>Reverse</i> WT:	5' – CAT TCT GCA GCG GTG CAC GGC – 3'
<i>Reverse</i> KO:	5' – CAT AGC GTT GGC TAC CCG TGA – 3'

La PCR es va realitzar utilitzant el kit comercial *GoTaq Hot Start Polymerase* (Promega Corporation) amb les condicions que es descriuen a la Taula 9.

Taula 9. Components de la reacció de PCR per a la genotipació de la colònia Sandhoff.

Reactiu	Volum per 1 reacció (µl)
5X GoTaq Flexi Green Buffer	3
MgCl ₂ (25mM)	0,96
dNTP (2.5 mM)	0,96
Oligonucleòtid <i>Forward</i> comú (20 µM)	0,3
Oligonucleòtid <i>Reverse</i> WT (20 µM)	0,6
Oligonucleòtid <i>Reverse</i> KO (20 µM)	0,3
GoTaq Hot Start Polymerase (5U/µl)	0,2
DNA genòmic	2
Aigua Mili-Q	6,68
Volum final	15

La PCR es realitzar a un termocilador *MasterCycler Eppendorf Gradient S* (Eppendorf) i es va basar en una desnaturalització inicial del DNA genòmic de 3 min a 94°C, seguida de 12 cicles d'una amplificació més específica del DNA que inclouen una desnaturalització de 25 s a 94°C, una hibridació de 35 s a 62,1°C i una elongació de 20 s a 72°C. A continuació, hi havia 25 cicles que constaven d'una desnaturalització de 25 s a 94°C, una hibridació de 35 s a 56,1°C i una elongació de 20 s a 72°C. Per acabar, hi havia una fase final d'elongació de 2 min a 72°C.

Després de la PCR, les mostres es van carregar a un gel d'agarosa al 2% amb bromur d'etidi o RedSafe que es va córrer a 100-120 V, per tal de permetre la separació i la resolució dels fragments de DNA. La mida esperada de les bandes era de ~100 parells de bases (*base pares*, bp) pels ratolins WT (*HexB^{+/+}*), dues bandes de ~100 i ~200 bp pels heterozigots (*HexB^{+/-}*) i una banda de ~200 bp pels ratolins homozigots per la mutació al gen *HexB* (*HexB^{-/-}*).

2.1.2.2. Colònia de ratolins Tay-Sachs

L'estratègia de genotipatge permetia discriminar entre l'al·lel WT i l'al·lel mutat. En aquest cas, es van utilitzar dos parells d'oligonucleòtids, un d'ells reconeixia una zona específica de l'al·lel WT (*Forward* WT i *Reverse* WT) i un altre parell d'oligonucleòtids reconeixia una zona específica de l'al·lel KO (*Forward* KO i *Reverse* KO).

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats van ser:

Forward WT: 5' – GGT GTA TGT GTA ACA CTC GTG G – 3'

Forward KO: 5' – CAG TTC TAG GCT CAG AAT GAG G – 3'

Reverse WT: 5' – CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC – 3'

Reverse KO: 5' – AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC – 3'

La PCR es va realitzar utilitzant el kit comercial *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase* (Promega Corporation) amb les condicions que es descriuen a la Taula 10.

Taula 10. Components de la reacció de PCR per a la genotipació de la colònia Tay-Sachs.

Reactiu	Volum per 1 reacció (µl)
<i>5X GoTaq Flexi Green Buffer</i>	3
MgCl ₂ (25mM)	1,6
dNTP (2,5 Mm)	1,6
Oligonucleòtid <i>Forward</i> WT (20 µM)	0,3
Oligonucleòtid <i>Forward</i> KO (20 µM)	0,3
Oligonucleòtid <i>Reverse</i> WT (20 µM)	0,35
Oligonucleòtid <i>Reverse</i> KO (20 µM)	0,35
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i> (5U/µl)	0,06
DNA genòmic	0,5
Aigua Mili-Q	6,94
Volum final	15

Per a l'amplificació del DNA genòmic, es va utilitzar la mateixa reacció de la PCR explicada anteriorment per al genotipatge de la colònia Sandhoff. Posteriorment, també es va utilitzar un gel d'agarosa al 2% amb bromur d'etidi o RedSafe que es va córrer a 100-120V, per tal de separar i resoldre els diferents fragments de DNA amplificats. La mida esperada de les bandes era de 430 bp pels ratolins WT (*HexA^{+/+}*), dues bandes de 280 i 430 bp pels ratolins heterozigots (*HexA^{+/-}*) i una banda de 280 bp pels ratolins homozigots per la mutació al gen *HexA* (*HexA^{-/-}*).

2.2. Tècniques de manipulació del DNA

2.2.1. Preparació del DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA plasmídic es van realitzar seguint el protocol de lisi alcalina descrit prèviament (Birnboim, 1978). Per tal d'obtenir quantitats més grans de DNA plasmídic, es va usar el kit comercial de *PureYield™ Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation), mentre que per quantitats encara més grans de DNA plasmídic es va fer servir l'*EndoFree Plasmid Mega/Giga Kit* (Qiagen).

2.2.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció

Per cadascun dels enzims de restricció que es van utilitzar per a construir dels plasmidis o bé digerir el DNA de forma específica, es van fer servir unes condicions específiques de reacció pel que fa a la força iònica, el pH, la temperatura i el temps. Per aquest motiu, es van utilitzar les condicions de digestió proporcionades per les cases comercials (New England Biolabs, Roche o Fermentas). En la majoria de casos, el procediment va ser el següent: 1 µg de DNA es va digerir amb 0,5 unitats d'enzim durant 1 hora amb el tampó específic indicat pel fabricant. Seguidament, els productes de la digestió es van analitzar mitjançant els gels d'agarosa a l'1% p/v. Quan la digestió del DNA es va dur a terme amb dos enzims de restricció diferents, aquesta es va realitzar alhora, sempre que els 2 enzims poguessin actuar adequadament amb el mateix tampó i temperatura. En el cas que un dels dos o bé els dos enzims no puguin funcionar òptimament amb el mateix tampó, es va suplementar amb més quantitat d'enzim en funció de la seva eficiència de tall. Per exemple, si teòricament un dels dos enzims digereix a un 50% del seu rendiment mentre l'altre digereix al 100% amb un determinat tampó, es va utilitzar el doble de quantitat d'enzim per digerir 1 µg de DNA durant 1 h de l'enzim amb una eficiència de tall del 50% en aquestes condicions. En el cas que els enzims presentessin requeriments diferents, es va purificar el DNA després de la primera digestió per tal d'eliminar-ne les sals, els enzims i d'altres restes de la reacció anterior utilitzant el kit comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Fermentas), seguint el protocol de la casa comercial. Finalment, es va eluir el DNA en 30 µl d'aigua i es va digerir amb el segon enzim de restricció utilitzant les seves condicions òptimes requerides.

2.2.3. Purificació i resolució del DNA

La separació, identificació i purificació de fragments de DNA es va realitzar mitjançant l'electroforesi en gel d'agarosa al 1% v/p. En primer lloc, els gels d'agarosa es van preparar dissolvent l'agarosa en un tampó d'electroforesi 1x TAE (Tris-acetat pH 8.3, 40 mM i EDTA 1 mM) juntament amb 0,5 µg/mL de bromur d'etidi o RedSafe (1X). Seguidament, es van carregar les mostres al gel d'agarosa amb el tampó de càrrega (1X) (Thermo Fisher Scientific Inc.) i es van córrer les mostres amb tampó d'electroforesi 1x TAE a uns 80-100 V.

La visualització del DNA en el gel d'agarosa es va aconseguir gràcies a l'addició de baixes concentracions de bromur d'etidi (0.5 µg/ml) o RedSafe (1x) (iNtRON Biotechnology). La visualització dels diferents fragments de DNA en el gel d'agarosa es va aconseguir amb la utilització d'una llum ultraviolada de baixa longitud d'ona (310 nm) amb una càmera integrada en un transil·luminador (Syngene). Per saber la mida dels diferents fragments de DNA separats i resolts, es va calcular comparant la seva posició relativa al gel d'agarosa respecte als marcadors de pes molecular de DNA d'1 kb i/o de 100 bp (Invitrogen).

Per a l'extracció i la purificació d'algun dels fragments de DNA separats i resolts, es va utilitzar el kit comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Fermentas). Finalment, la quantificació del DNA es va dur a terme amb un espectrofotòmetre (Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific; o Synergy HTX, BioTek Instruments).

2.2.4. Desfosforilació dels fragments de DNA

Un cop digerit, el DNA plasmídic pot tornar a relligar. Per aquest motiu, aquest procés es pot evitar mitjançant l'eliminació dels residus fosfat dels extrems 5' del DNA. Per dur a terme la desfosforilació, es va utilitzar una unitat de fosfatasa alcalina (*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Fermentas) amb el tampó comercial corresponent a 1x per cada 1-5 µg de DNA. La reacció de desfosforilació es va realitzar durant 10 min a 37 °C. Posteriorment, es va inactivar l'enzim a 75 °C durant 5 min per evitar qualsevol reacció de la fosfatasa alcalina a la posterior reacció de lligació amb l'insert.

2.2.5. Lligació dels fragments de DNA

La construcció de molècules híbrides de DNA a partir de diferents fragments de DNA és un procediment conegut com a lligació, que es duu a terme gràcies a l'acció de l'enzim *T4 DNA ligase* (New England Biolabs). Els fragments de DNA d'interès es van afegir a diferents proporcions molars de vector : insert amb l'enzim *T4 DNA ligase* i el tampó corresponent suplementat amb adenosina trifosfat (ATP) durant 30 min a temperatura ambient, seguint les instruccions de la casa comercial.

2.2.6. Transformació de les cèl·lules competents

Els plasmidis es poden introduir a dins dels bacteris elèctricament competents mitjançant un procés de transformació elèctrica o electroporació. Es van utilitzar 40 µl de cèl·lules competents *E. coli* XL2-blue (2×10^{10} cèl·lules/ml), prèviament descongelades en gel, a les quals se'ls va afegir aproximadament 10 ng de DNA en un volum final d'1 µl. Després d'una incubació de 5 min en gel, les cèl·lules es van electroporar a 2.500 V utilitzant un electroporador (Bio-Rad). Posteriorment, es van afegir 200 µl de medi LB preescalfat a 37 °C a la solució d'electroporació. Finalment, es van sembrar en una placa sobre medi LB amb l'antibiòtic apropiat i es van deixar créixer a 37 °C durant tota la nit.

Per altra banda, el DNA plasmídic també es pot introduir a dins dels bacteris químicament competents (Stbl3 i Dh5α) mitjançant xoc tèrmic. En aquest cas, les cèl·lules competents i el DNA es van deixar en gel durant 30 min. Seguidament, es va realitzar un xoc tèrmic a 42 °C durant 45 s, en el cas de les cèl·lules Stbl3, o a 37 °C durant 20 s, en el cas de les Dh5α. Posteriorment, es van incubar 60 s en gel i es va realitzar la sembra en una placa sobre medi LB amb l'antibiòtic corresponent.

2.3. Tècniques d'obtenció i manipulació del RNA

2.3.1. Homogeneïtzació del teixit per a l'obtenció del RNA

El RNA es va obtenir dels diferents teixits congelats en nitrogen líquid just després de l'extracció. Els teixits es van homogeneïtzar utilitzant l'homogeneïtzador mecànic *Tissue Lyser LT* (QIAGEN), seguint el protocol recomanat pel fabricant. Es van transferir uns 30 mg de teixit en un tub de 2 mL, on prèviament s'havia introduït una bola d'acer inoxidable de 5 mm de diàmetre i s'havia deixat 15 min en gel sec. Seguidament, les mostres de teixit que estaven als tubs es van deixar durant 15 minuts més en gel sec, després 2 min a temperatura ambient i, finalment, es va afegir 1 ml de *TriPure*

Isolation Reagent (Roche). Posteriorment, es van homogeneïtzar els teixits durant 3 min a 50 HZ en el *Tissue Lyser* (QIAGEN). El teixit disgregat es va transferir a un tub nou i les mostres es van emmagatzemar a -80°C fins a la seva utilització.

2.3.2. Aïllament i purificació del RNA total

Per a l'extracció del RNA, es va utilitzar una extracció de fenol-cloroform de teixits homogeneïtzats i es va utilitzar la tiocianat guanidina com a inhibidor de la ribonucleasa. La fracció corresponent al RNA es va extreure amb l'addició de 0,2 mL de cloroform per cada mL de Tripure i, seguidament, les mostres es van centrifugar durant 15 min a 10000g. Es va recollir la fase aquosa, que es trobava a la part superior, es va barrejar amb etanol 70% a una proporció 1:1 i es va passar a les columnes d'adsorció, *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), per a la posterior purificació del RNA. A la mateixa columna de purificació, les mostres es van tractar amb DNasa I, *RNase-Free DNase Set* (QIAGEN) durant 15 min, per tal d'eliminar qualsevol possible contaminació amb DNA. Després de fer els rentats a la columna amb els buffers subministrats pel fabricant, es van eluir les mostres de RNA amb 30-50 µl d'aigua Mili-Q. Finalment, es va determinar la concentració i la puresa del RNA mesurant l'absorbància al rang ultraviolat amb l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific) o bé Synergy HTX (BioTek Instruments).

2.3.3. Síntesi del cDNA

Es va sintetitzar el cDNA a partir d'1 µg de RNA que es va retrotranscriure amb el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche), seguint les instruccions del fabricant, al termociclador *MasterCycler Eppendorf Gradient S* (Eppendorf). La reacció constava de dues etapes: la primera que consistia en barrejar l'RNA amb Oligo-dT i hexàmers aleatoris, incubar-ho durant 10 min a 65°C i mantenir-ho a 4°C per evitar la degradació del RNA; i, durant la segona etapa, es van afegir inhibidors de RNases, el tampó de la reacció, dNTPs i la transcriptasa reversa a les mostres per tal de dur a terme l'amplificació del cDNA. Aquesta segona incubació es va realitzar durant 15 min a 25 °C, 45 min a 55 °C i 5 min a 85 °C, i es van deixar les mostres altre cop a 4 °C. Les mostres finalment es van diluir 1/10 amb aigua Mili-Q i es van guardar a -20 °C fins a la seva utilització.

2.3.4. Quantificació de l'expressió del mRNA per qPCR

L'anàlisi de l'expressió dels diferents gens es va dur a terme mitjançant la PCR quantitativa (qPCR). La qPCR es va realitzar en el *LightCycler® 480* (Roche) i *QuantStudio 5* (Applied Biosystems) amb el kit *LightCycler® 480 SybrGreen I Master* (Roche), seguint les instruccions del fabricant (Taula 12). Els oligonucleòtids utilitzats s'indiquen a la Taula 11.

Taula 11. Llista d'oligonucleòtids utilitzats a la qPCR.

Gen	Oligonucleòtid (5'→3')	
<i>mmPlp1</i>	Forward	TTCCAGAGGCCAACATCAAG
	Reverse	AGGAGCCATACAACAGTCAG
<i>mmUgt8</i>	Forward	AGTTTCCAAGACCAACGCTGC
	Reverse	TGTTCCCTGAGCACCCTTACC
<i>mmHexA</i>	Forward	ACT CAC ATC TAC ACA GCA CAG
	Reverse	TCA AAT TCT GCC AGC ACA CG
<i>mmHexB</i>	Forward	AAA ACT CTG GAT GCC ATG GC
	Reverse	AAG ACT GGT CGT CCA CTA TGT
<i>mmPpia</i>	Forward	CCC ACC GTG TTC TTC GAC AT
	Reverse	CAC CCT GGC ACA TGA ATC CT
<i>mmTbp</i>	Forward	TGA CTC CTG GAA TTC CCA TC
	Reverse	TGC TGC TGT CTT TGT TGC TC
<i>mmCD68</i>	Forward	TGG CGG TGG AAT ACA ATG TG
	Reverse	TGC TTG CAT TTC CAC AGC AG
<i>mmCcl3</i>	Forward	GCA ACC AAG TCT TCT CAG CG
	Reverse	AGC AAA GGC TGC TGG TTT CA
<i>mmCcl4</i>	Forward	CCA TGA AGC TCT GCG TGT CT
	Reverse	GAG AAA CAG CAG GAA GTG GGA
<i>mmCxcl10</i>	Forward	CCA AGT GCT GCC GTC ATT TT
	Reverse	AGC TTC CCT ATG GCC CTC AT
<i>mmTGF1β</i>	Forward	ATG CTA AAG AGG TCA CCC GC
	Reverse	TGC TTC CCG AAT GTC TGA CG
<i>mmMcp1</i>	Forward	AAC TGC ATC TGC CCT AAG GT
	Reverse	AAG TGC TTG AGG TGG TTG TG
<i>mmTGF1β</i>	Forward	CTG TAG CCC ACG TCG TAG C
	Reverse	TTG AGA TCC ATG CCG TTG

mm: *Mus musculus*.

Taula 12. Components de la qPCR mitjançant SybrGreen.

Reactiu	Volums per 1 reacció (µL)
2x LightCycler 480 SybrGreen I Master	5
Oligonucleòtid <i>Forward</i> (10 mM)	0,2
Oligonucleòtid <i>Reverse</i> (10 mM)	0,2
Aigua Mili-Q	2,6
cDNA diluït 1/10	2
Volum total	10

La reacció de la qPCR es va basar en una desnaturalització inicial durant 5 min a 95 °C i, posteriorment, es van dur a terme 45 cicles d'amplificació del DNA en 4 etapes: la desnaturalització (10 s a 95 °C), l'*annealing* (10 s a 60 °C), l'amplificació (10 s a 72 °C) i una fase final de 30 s a 60 °C. Abans de refredar la reacció a 4 °C, es va deixar 5 s a 95 °C i 1 min a 65 °C.

Els nivells d'expressió d'un gen s'expressen amb Cts, que indiquen el cicle a partir del qual la quantitat de cDNA del gen diana ha amplificat. Les Cts del gen d'interès de les mostres s'ajusten a les Cts del gen normalitzador, per cada una de les mostres.

2.4. Transfecció de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic

Per la transfecció *in vitro* de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic, es va utilitzar el protocol comercial *LipofectamineTM 2000* (Invitrogen), que es basa en la transfecció de DNA amb liposomes catiónics. El protocol va consistir en la transfecció de cultius de cèl·lules HEK-293 adherides en plaques de 24 pous (Thermo Fisher Scientific) amb 0,8 µg de DNA plasmídic, que prèviament s'havien inclòs a l'interior dels liposomes catiónics formats per la Lipofectamina, tot seguint les instruccions de la casa comercial. Posteriorment, els cultius cel·lulars HEK-293 transfectats es van incubar durant 48 hores a 37°C amb una atmosfera humidificada al 5% de CO₂ a l'aire. Finalment, es va recollir directament el medi de cultiu i, després d'un rentat en PBS, les cèl·lules en 500 µl de H₂O Mili-Q. El medi de cultiu es va centrifugar dues vegades a 400 g durant 5 min per tal d'eliminar possibles restes cel·lulars. Les mostres es van emmagatzemar a -80 °C fins al seu posterior anàlisi.

2.5. Producció, purificació i titulació dels vectors virals adenoassociats

2.5.1. Producció i purificació

Els vectors virals AAV9 de cadena simple es van generar en cultius cel·lulars HEK-293 cultivats en *Roller bottles* (RB) (Greiner Bio-One) utilitzant el protocol de triple transfecció (Ayuso, 2010) que implica la utilització de 3 plasmidis. Aquest protocol es basa en la precipitació dels vectors virals utilitzant el PEG i la ultracentrifugació amb gradients de CsCl, que permet eliminar majoritàriament el contingut de càpsides buides i disminuir les impureses proteiques, i per tant, augmenta la puresa de la preparació viral final, la qual cosa resulta en uns nivells de transducció *in vivo* més elevats (Ayuso, 2010).

Les cèl·lules HEK293 es van cultivar fins a assolir aproximadament un 80% de confluència en el medi DMEM suplementat amb un 10% de FBS + 1% Penicil·lina/estreptomicina. Aleshores, cada RB es va co-transfectar en 15 ml de PEI MAX (Polysciences) - DNA (en una proporció 2:1 p/p) en DMEM + 1% Penicil·lina/estreptomicina. La mescla de DNA estava formada per: 1) 20 µg del plasmidi d'interès, que contenia el CDS del gen o gens d'interès, el promotor Cbh i la seqüència poliA SV40, tot plegat flanquejat per les ITR, que són unes seqüències que van permetre la correcta encapsidació; 2) 100 µg del plasmidi auxiliar pRep2Cap9 que codifica els gens AAV Rep2 i Cap9, necessaris per la producció de les proteïnes necessàries per la replicació viral i les proteïnes de la càpsida proteica de les partícules virals, respectivament; i 3) 100 µg del plasmidi *pAdHelper* que contenia els gens codificants per les proteïnes adenovirals auxiliars necessàries. Els plasmidis pRepCap9 i *pAdHelper* van ser cedits per la Dra. Katherine High del *Children's Hospital of Philadelphia*.

Tres dies després de la co-transfecció, es van recollir les cèl·lules i es van centrifugar a 2500 g durant 15 min a 4 °C. El medi de cultiu es va guardar a 4 °C i el pellet cel·lular es va reconstituir en tampó TMS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 8.0) i es va sonicar per lisar les cèl·lules i alliberar el virus del seu interior. El lisat es va centrifugar a 2500 g durant 30 min i el sobrenedant resultant d'aquesta centrifugació es va afegir al medi de cultiu, prèviament guardat a 4 °C. Seguidament, es van precipitar les partícules virals mitjançant una incubació de 15 h en PEG 8000 al 8% (Sigma) a 4 °C. A continuació, els vectors es van precipitar per centrifugació a 4000 g durant 30 min. El nou pellet, que contenia els vectors virals procedents tant del medi de cultiu com del lisat cel·lular, es va reconstituir amb TMS tractat amb benzonasa (Merk) durant 1 h a 37°C i, finalment, es va centrifugar a 10000 g durant 10 min. El sobrenedant

resultant es va carregar en tubs de 37,5 ml *Ultra clear* (Beckman) que contenien un gradient discontinu de CsCl de densitat 1,5 g/ml (5 ml) i 1,3 g/ml (10ml). Seguidament, aquests tubs es van centrifugar durant 17 h a 27000 rpm en un rotor SW28 (Beckman). Les bandes que contenien els vectors virals (Figura 64) es van recollir utilitzant unes agulles de 18 G i, posteriorment, es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12,5 ml. La resta del tub de 12,5 ml es va emplenar amb CsCl a 1,379 g/ml per a generar un gradient continu. Aquests tubs es van centrifugar a 38000 rpm en un rotor SW49Ti (Beckman) durant 48 h (Figura 64) . Finalment, els AAV que van encapsidar el gen d'interès es van recollir i dialitzar amb PBS + 0.001% Plurònic F68 mitjançant una membrana de 10 kDa (Thermo Fisher Scientific), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0,22 µm (Millipore).

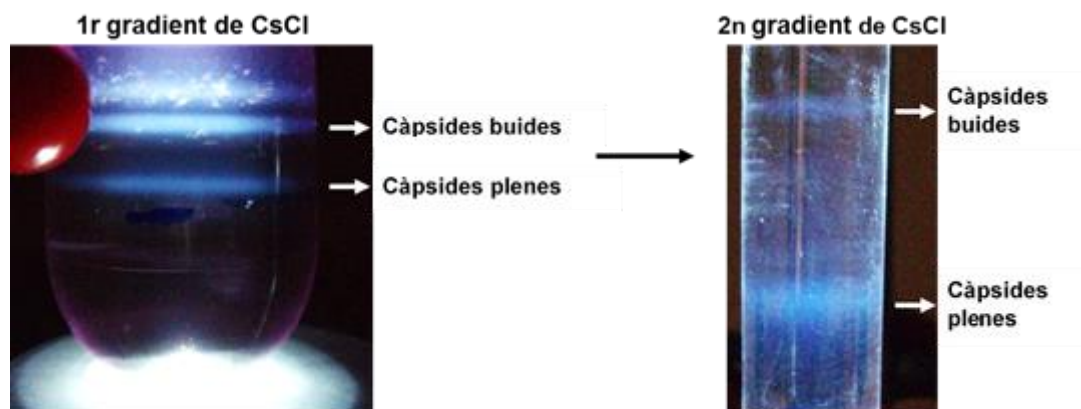


Figura 64. Imatge obtinguda de la separació de les bandes de càpsides plenes i buides durant la purificació dels vectors AAV. El primer gradient de CsCl s'utilitza per a separar les càpsides plenes (vectors virals que contenen el transgèn d'interès) de les càpsides buides (vectors virals que no contenen el transgèn d'interès), així com també d'una gran part de les impureses. Mentre que el segon gradient ens permet separar les càpsides plenes de les impureses que presenten una densitat similar i també de les càpsides buides i les espècies intermitges. Adaptat d'Ayuso, 2010.

2.5.2. Titulació de genomes virals

El sistema *PicoGreen* (Thermo Fisher Scientific) va permetre la titulació dels genomes virals dels diferents lots de vectors AAV produïts. Paral·lelament, també es va quantificar un vector de referència amb una titulació coneguda per tal de validar els resultats obtinguts de la titulació dels lots de vectors AAV produïts. El *PicoGreen* és un fluorocrom d'alta sensibilitat que s'uneix al DNA de doble cadena, sent molt robust a la contaminació per proteïnes, RNA o DNA de cadena simple. En primer lloc, es van lisar les càpsides proteiques per tal d'alliberar el DNA de cadena simple positiva i negativa encapsidat als vectors virals AAV, de tal manera que puguin hibridar entre ells per tal de generar un DNA de cadena doble. Un DNA de concentració coneguda (fag lambda), subministrat pel fabricant, es va utilitzar per tal de generar una corba de calibratge. En

paral·lel, també es van processar els vectors sense lisar, per tal d'assegurar que el títol dels vectors virals AAV no s'hagués sobreestimat a causa de la presència de DNA contaminant (fora de la càpsida) provinent ja sigui dels plasmidis de la transfecció o bé de les cèl·lules HEK-293. Així doncs, el valor que es va quantificar del DNA no encapsidat es va restar al títol obtingut del vector lisat.

Per tal de lisar les mostres, es van afegir 2 µl de cada preparació de vector viral a 8 µl de PBS + 0,001% Pluronic F68 i 10 µl de tampó de lisi (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl i 0,2% SDS, pH 7,4, i es van incubar 1 h a 70°C. Paral·lelament, es van afegir 2 µl de les mostres no lisades de cada preparació de vector viral a 8 µl de PBS + 0,001% Pluronic F68 i 10 µl de tampó TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8), i es van mantenir a temperatura ambient. Posteriorment, es van afegir 180 µl de tampó TE als 20 µl de les mostres lisades i no lisades. Per tal de generar la corba de calibratge, es va fer una dilució seriada del DNA de referència amb el tampó TE.

Finalment, es van afegir 180 µl de *PicoGreen* a una concentració 1X en el tampó TE en una placa negra de 96 pous. A continuació, es van afegir per triplicat 20 µl del DNA de referència, de les mostres no lisades, de les mostres lisades i dels blancs (tampó TE). Després d'excitar el fluorocrom a 485nm, es va mesurar la fluorescència a 535nm en el fluorímetre *Synergy HTX* (BioTek Instrument). El valor de fluorescència dels blancs (soroll de fons) es va restar a la resta de pous. A més, també es va restar el valor de fluorescència de les mostres no lisades al valor de les mostres lisades (on el genoma viral es troba en forma de doble cadena). El títol de les diferents preparacions de vectors virals AAV (Taula 13) es va obtenir després de la interpolació de la fluorescència obtinguda a la regressió lineal de la fluorescència de la corba de calibratge.

Taula 13. Quantificació dels genomes virals

Vector viral	Títol (vg/ml)
AAV9-Cbh	$5,92 \times 10^{13}$
AAV9-Cbh-omHexA	$5,32 \times 10^{13}$
AAV9-Cbh-omHexB	$4,94 \times 10^{13}$
AAV9-Cbh-omHexA-L1-omHexB	$1,07 \times 10^{14}$
AAV9-Cbh-omHexA-L2-omHexB	$1,15 \times 10^{14}$
AAV9-Cbh-omHexA-L3-omHexB	$1,08 \cdot 10^{14}$

2.5.3. Quantificació de les partícules virals

L'anàlisi de les preparacions de vectors virals per a determinar la quantitat de càpsides produïdes es va realitzar en gels d'acrilamida SDS-PAGE i la tinció amb *Sypro Ruby*. La comparació d'aquest valor amb el nombre de genomes virals permet conèixer el percentatge de càpsides buides de cada preparació de vectors virals (genomes virals/ nombre de càpsides). Tanmateix, aquest mètode també permet visualitzar el grau de contaminació de la preparació de vectors virals amb altres proteïnes no virals, que podrien afectar l'eficiència de transducció *in vivo*.

El procediment es va dur a terme de la següent manera. Un volum apropiat del vector d'interès i diferents dilucions d'un vector de referència de concentració coneguda es van barrejar amb Laemmli 4X a un volum final de 20 µl. Seguidament, es van incubar les mostres 5 min a 95°C, es van carregar a un gel d'acrilamida Bis-Tris de 15 mm de 15 pous (Thermo Fisher Scientific) i es van córrer a 120 V durant 2,5 h. Les proteïnes del gel es van fixar amb Metanol-Acètic. A continuació, el gel carregat amb les mostres es va incubar en 100 ml de *Sypro Ruby Protein Gel Staining* (Thermo Fisher) durant tota la nit. L'endemà al matí es van realitzar dos rentats del gel, el primer en metanol-acètic i el segon en aigua Mili-Q. Finalment, es va mesurar la fluorescència de les proteïnes en un transil·luminador UV (Syngene).

El títol de les partícules virals es va obtenir per densitometria. A partir de la intensitat de la proteïna VP3 de cada una de les dilucions del vector de referència, es va generar una corba de calibratge, que va permetre interpolar la concentració de les preparacions de vectors virals analitzades.

2.6. Administració intracisterna magna dels vectors AAV9 a ratolins

L'administració intracisterna magna dels vectors virals AAV9 a ratolins es va realitzar sota pauta anestèsica, administrada mitjançant una injecció intraperitoneal de Xilacina (10 mg/kg) i Ketamina (100 mg/kg). Una vegada els animals estaven ben anestesiats, es va rasurar el pèl de la part posterior del cap, just per sota les orelles fins aproximadament entre les escàpules, i es va realitzar una incisió rostro-caudal de 2-3 mm. Els animals es van col·locar en posició decúbit supí, amb el cap inclinat lleugerament cap avall en un angle d'aproximadament 60° respecte l'horitzontal, per tal d'exposar la regió entre l'os occipital del crani i la vèrtebra C1. Seguint el mateix angle d'inclinació, es va introduir una agulla de 34G unida a una xeringa *Hamilton* (Hamilton Company) a dins de la cisterna magna. A continuació, es van administrar 5 µl del vector viral a la dosi escollida. Com que l'encèfal era el principal òrgan diana, tots els ratolins

van ser administrats amb la mateixa dosi de genomes virals, independentment del gènere o del pes corporal. Un cop finalitzada l'administració del vector viral, es va retirar l'agulla i es va tancar la incisió a la pell amb l'adhesiu tissular *Histoacryl*® (B. Braun).

2.7. Obtenció de mostres de sèrum *in vivo*

Després de l'administració intracisterna dels ratolins, es van extreure periòdicament mostres de sang de la cua de l'animal. El procediment va consistir en tallar un petit fragment de cua per tal de recollir uns 200-300 µl de sang en un capil·lar. Per facilitar l'extracció de sang, els ratolins es van exposar a una llum infraroja de 250 W (Philips). A continuació, es va centrifugar la sang a 6000 g durant 10 min a 8°C. Finalment, es va recuperar el sobrenedant, el sèrum, que es va transferir a un tub nou i es va guardar al congelador a -80°C fins al dia del seu processament.

2.8. Eutanàsia i obtenció de mostres biològiques *post mortem* de ratolins

Per l'extracció de mostres biològiques de ratolins, els animals es van anestesiar mitjançant una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) i Xilacina (10 mg/kg). A continuació, es va obtenir sang per punció intracardíaca del ventricle esquerre i, immediatament, es van perfondre els ratolins amb 12 ml de PBS, per tal d'eliminar la sang dels vasos sanguinis dels diferents teixits i evitar possibles interferències en les anàlisis posteriors. Una vegada perfosos, es va procedir a la dissecció dels teixits i òrgans d'interès dels animals. En el cas del cervell, es va dividir longitudinalment en dos hemisferis (dret i esquerre) i cadascun d'ells es va subdividir en 5 regions coronals, essent la secció "I" la més frontal i la regió "V" la més caudal (Figura 65). Tots els teixits es van mantenir a -80°C fins al dia del processament de les mostres. Una part de cadascun del teixits (en el cas del cervell, un hemisferi sencer) es va mantenir en paraformaldehid al 4% (ThermoFisher) durant tota la nit a 4°C, per tal de realitzar la inclusió en blocs de parafina o bé en *Optimal Cutting Temperature* (OCT) que es van congelar a -80°C. Les mostres de sang es van centrifugar a 6000 g durant 10 min a 8°C. Es va recuperar el sobrenedant (el sèrum), que es va transferir a un nou tub i es va mantenir a -80°C fins al seu processament.

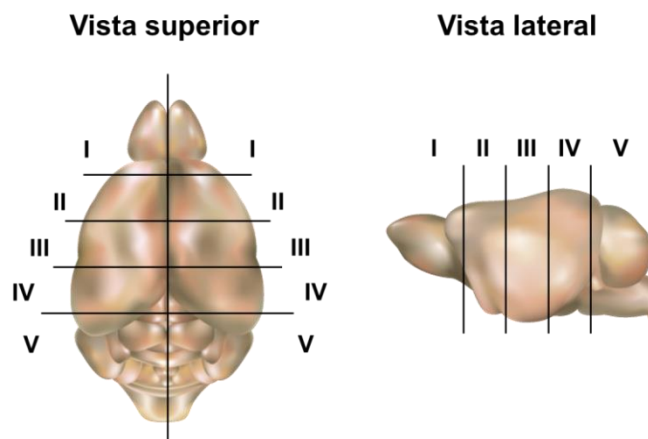


Figura 65. Divisions de l'encèfal de ratolí en diferents parts per a posteriors determinacions.

2.9. Western blot

2.9.1. Obtenció dels extractes proteics

Els extractes proteics provinents de la secció V del cervell es van obtenir mitjançant l'homogeneïtzació per sonicació en 300 µl de tampó de lisi (Tris 50 mM pH 7,5, sucrosa 0,27 M, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, Na-β-glicolfosfat 10 mM, Ppi 5 mM, Tritó X-100 1%), el qual estava suplementat amb un inhibidor de proteases (*Complete®*, 1 pastilla/50 ml) (Roche). Els extractes proteics sonicats es van centrifugar a 10.000 g durant 10 min a 4°C i es va recuperar el sobrenedant.

2.9.2. Determinació de la concentració de proteïnes pel mètode del BCA

A partir dels extractes proteics de cervell, es va determinar la concentració de proteïna mitjançant el mètode de l'àcid bicinconínic (*bicinchoninic acid assay*, BCA) (Thermo Fisher Scientific), seguint les instruccions de la casa comercial. El mètode del BCA es basa en la reducció del Cu^{2+} a Cu^+ a causa de la proteïna present en un medi alcalí, que es mesura per un canvi colorimètric altament sensible.

Per una banda, es van barrejar dos reactius del BCA en una proporció 1:50, i per l'altra banda, es van diluir les mostres amb tampó de lisi a una dilució apropiada. En una placa de 96 pous transparent, es van afegir 10 µl de mostra i 190 µl de la mescla de reactiu BCA a cada pou. La placa es va incubar durant 30 min a 37°C i es va llegir l'absorbància a 565 nm amb l'espectrofotòmetre *Synergy HTX* (BioTek Instruments). Finalment, els càlculs de la concentració proteica de les mostres es van realitzar a partir d'una extrapolació de la regressió lineal de la recta patró, generada amb albúmina sèrica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) (2 µg/ µl) en dilucions successives (0-20 µg) i

carregada per duplicat a la mateixa placa. Els valors d'absorbància dels blancs (soroll de fons) es van restar als valors de la recta patró i les mostres.

2.9.3. Electroforesis en gels d'acrilamida (SDS-PAGE)

L'anàlisi de l'expressió proteica es va realitzar mitjançant l'electroforesis dels extractes proteics en gels d'acrilamida de dues fases en presència de SDS. El primer gel, de compactació o *stacking*, (5 % p/v acrilamida/bisacrilamida, 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % p/v SDS, 2,7 % v/v TEMED, 1,3% p/v Persulfat d'amoni), tenia una baixa concentració d'acrilamida permetent la compactació de les proteïnes en un únic front. Després, a la part baixa hi ha el gel separador o *resolving*, que permetia que les proteïnes se separessin en funció del seu pes molecular (17 % w/v acrilamida/bisacrilamida, 0,375 M Tris-HCl, 0,1 % p/v SDS, 0,02 % p/v persulfat d'amoni, 0,01 % v/v TEMED). Abans de carregar el gel d'acrilamida, 10 µg dels extractes proteics es van incubar amb 0,2 volums de tampó de càrrega Laemli 6x (20 mM tampó fosfat pH 7, 30% v/v glicerol, 4 % w/v SDS, 2 % v/v β-mercaptoetanol, amb blau de bromofenol) durant 3 min a 95°C. Un cop carregades les mostres al gel, es va realitzar l'electroforesis amb un tampó d'electroforesi (25 mM Tris, 200 mM glicina, 0,1 % w/v SDS), primerament a 50 V fins que les mostres van estar ben apilades en el gel de *stacking* i després a 100V durant 1,5-2h. Com a referència, es va utilitzar el marcador de pes molecular per proteïnes pretenyit de rang ampli (*MultiColor Broad Range*, Thermo Fisher Scientific).

2.9.4. Electrotransferència de les proteïnes a la membrana de PVDF

El següent pas va ser l'electrotransferència de les proteïnes des del gel d'acrilamida a les membranes de PVDF *Immobilon-P* (Millipore), que es va realitzar amb el tampó de transferència (25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% v/v metanol), durant 1,5 h a 100V a 4°C. Abans de l'electrotransferència, les membranes de PVDF es van activar amb metanol i es van equilibrar utilitzant el tampó de transferència. Per comprovar que la transferència de les proteïnes fos correcte, es va fer una tinció amb *ponceau*, un colorant que s'uneix de manera reversible a les proteïnes. Per acabar, si les membranes s'havien de fer servir al mateix moment es van deixar en tampó TBS (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl); sinó, es rentaven durant 5 s amb metanol i es deixaven assecar.

2.9.5. Incubació i revelat

En primer lloc, es va bloquejar la membrana amb *blotto* al 5% (5% p/v de llet en pols desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,05% *Tween 20*) durant 1 h a temperatura ambient. Després, es va dur a terme la incubació amb l'anticòs primari, a la

dilució corresponent, en *blotto* 5% (5% p/v de llet en pols desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,05% *Tween 20*) durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament, es van realitzar dos rentats ràpids i dos de 5 min en agitació amb TBS-T 0,05% (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,05% *Tween 20*). Posteriorment, es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari unit a la peroxidasa també diluït en *blotto* 5%, durant 1h a temperatura ambient. De nou, es van fer dos rentats ràpids i dos més de 10 min en agitació amb TBS-T 0,05% i un de 5 min en TBS. Per a dur a terme la immunodetecció es va utilitzar el producte comercial *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore), seguint les instruccions del fabricant. Finalment, la membrana es va exposar a un film fotosensible per tal de detectar i visualitzar la senyal. Les bandes es van quantificar per densitometria, mitjançant el programari lliure *ImageJ* (NIH).

2.10. Determinació de les activitats enzimàtiques

2.10.1. Quantificació del contingut proteic pel mètode del Bradford

El mètode del Bradford es va utilitzar per determinar el contingut proteic dels extractes cel·lulars o dels teixits on s'havien de determinar les activitats enzimàtiques. Aquest mètode és un procediment analític espectroscòpic utilitzat per a la quantificació del contingut proteic d'una mostra, basant-se amb el canvi de color del *Coomassie brilliant blue* després de formar complexos amb proteïnes. Aquest canvi de color provoca un canvi en el pic d'absorbància de 495 nm a 595 nm.

Per tal d'obtenir els extractes proteics, es van homogeneïtzar les diferents seccions del cervell o uns 50 mg de fetge en 200-500 µl d'H₂O Milli-Q utilitzant un sonicador a 30-40 V (*Ultrasonic Processor*, Sonics & Materials Inc.). Per eliminar les restes cel·lulars presents a l'extracte proteic, es van centrifugar a 10.000 g durant 10 minuts a 4°C i es va recuperar el sobrenedant. Posteriorment, es va preparar per duplicat una dilució apropiada dels extractes proteics en H₂O Milli-Q en un volum final de 800 µl i es van afegir 200 µl del reactiu de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad). El mateix tipus de preparació es va dur a terme amb 0-20 µg de BSA, per tal d'obtenir la recta patró, que ens permetrà extrapolar la quantitat de proteïna de les mostres. Un cop es va afegir el reactiu Bradford, es van agitar les mostres vigorosament i es van incubar 5 minuts a temperatura ambient. Finalment, es van transferir 200 µl de la recta patró o dels extractes proteics a una placa transparent de 96 pous. Es va realitzar la mesura de l'absorbància a 595 nm a un espectrofotòmetre Synergy HTX (BioTek Instruments). La concentració de proteïna als extractes es va extrapolar a partir dels valors d'absorbància obtinguts de la recta patró de concentració coneguda.

2.10.2. Determinació de les activitats d'enzims lisosòmics

La determinació de les activitats enzimàtiques es va realitzar amb els substrats comercials conjugats a la 4-metilumbeliferona (4MU), un compost fluorescent. La base teòrica de la tècnica consisteix en l'alliberació de la 4MU produïda per la hidròlisi del substrat gràcies a l'activitat enzimàtica específica. Quan la 4MU no es troba unida al substrat, emet fluorescència. Les condicions específiques de cada activitat es detallen a la Taula 14.

El primer pas del protocol va consistir en una incubació a una temperatura específica, depenent de l'activitat, i d'una determinada quantitat de proteïna total dels extractes proteics o una dilució concreta de les mostres de sèrum juntament amb el substrat corresponent diluït en el tampó apropiat (Taula 14). Dues de les activitats, la SGSH i la GALNS, necessiten una segona incubació. Transcorregut el temps i les incubacions necessàries, es va aturar la reacció enzimàtica mitjançant l'addició del tampó d'aturada alcalí (0,5 M NaHCO₃ / 0,5 M Na₂CO₃, pH 10,7 + 0,025 % de Tritó X-100). Es va llegir la fluorescència emesa en una placa negra de 96 pous a l'espectrofotòmetre *Synergy HTX* (BioTek Instruments), utilitzant un filtre d'excitació 360/40 nm i un filtre d'emissió 460/40 nm. La quantificació de l'activitat de les mostres es va calcular per extrapolació de la fluorescència detectada a una recta patró formada per dilucions seriades de 4MU i es va normalitzar per la quantitat de proteïna carregada, quantificada anteriorment amb el mètode de Bradford, o pel volum de sèrum utilitzat. Finalment, els resultats es van mostrar com a % de l'activitat WT, que va ser marcada com un 100%.

Taula 14. Condicions de les diferents activitats dels enzims lisosòmics.

Enzim	Mostra	Substrat	Tampó del substrat	Incubació	Tampó aturada	Casa comercial
β-HEXO	0.2 µg (teixit) 0.2-0.01 µl (sèrum)	4MU-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside	0,2 M Na ₂ HPO ₄ / 0,1 M àcid cítric pH 4,4	1 h, 37°C		Sigma
HEXA	0.2 µg (teixit) 0.4 µl (sèrum)	4MU-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside		1 h, 37°C		Sigma
GALNS	10 µg (teixit)	1. 4MU-β-D-galactopyranoside -6-sulfate 2. β-galactosidase	0,1 M Na-acetat / 0,1 M àc. acètic pH 4,3	Pas 1. 17 h, 37°C Pas 2. 2 h, 37°C	0.5 M NaHCO ₃ / 0.5 M Na ₂ CO ₃ + Tritó	Toronto Research Chemicals (substrat reacció 1) i Sigma (substrat reacció 2)
GUSB	15 µg (teixit)	4MU-β-D-glucuronide	0,1 M tampó acetat Ph 4,3	1 h, 37°C	0.025% pH 10.7	Sigma
HGSNAT	30 µg (teixit)	4MU-β-D-glucosamine + Acetyl-CoA	0,2 M Na ₂ HPO ₄ / 0,1 M àcid cítric pH 4,4	17 h, 37°C		Moscerdam (substrat reacció) i Sigma (AcCoa)
NAGLU	30 µg (teixit)	4MU-α-D-N-acetyl-glucosaminide	0,2 M Na ₂ HPO ₄ / 0,1 M àcid cítric pH 4,7	3 h, 37°C		Moscerdam
SGSH	30 µg (teixit)	1. 4MU-α-D-N-sulphoglucosamini de 2. α-glucosidase	Na-acetate buffer + 0,7 % NaCl, pH 6,5 +0,02 % (w/p) Na-azida	Pas 1. 17h, 47°C Pas 2. 24h, 37°C		Enantia (substrat reacció 1) i Sigma (substrat reacció 2)

2.11. Quantificació del contingut de GAGs

Per a la quantificació del contingut de GAGs, es va utilitzar el kit comercial *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay* (Biocolor). Aquest kit es basa en la unió específica del colorant *1,9-dimethylmethylene blue* (DMMB) amb GAGs sulfatats. Es van pesar els teixits (fetge, ronyó i melsa) i es van digerir durant tota la nit a 56°C en 800 µl de tampó fosfat (KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM, pH 8) suplementat amb 1 mg/ml de proteïnasa K. La proteïnasa K present a les mostres es va inactivar a 90°C durant 10 min. A continuació, les mostres es van centrifugar durant 10 min a 10.000 g i es van filtrar 500 µl del sobrenedant per centrifugació durant 5 min a 12.000 g (Ultrafree MC, Millipore). Després d'afegir els volums pertinents de cada teixit a un nou tub, es va afegir 1 ml de la solució colorant (*Dye Reagent*), i es van agitar les mostres durant 30 min per tal d'assegurar la unió del colorant i els GAGs. A continuació, les mostres es van

centrifugar a 12.000 g durant 10 min per tal d'obtenir un pellet format pel complex *Dye Reagent-GAGs*. Es va descartar el sobrenedant, on hi havia l'excés de colorant (*Dye Reagent*) i el precipitat *Dye Reagent-GAGs* es va resuspendre amb 300 µl de la solució de dissociació (*Dye Dissociation Reagent*), agitant-ho durant 15 min. Finalment, es van transferir 200 µl de la solució resuspensa a una placa transparent de 96 pous per tal de mesurar l'absorbància a 656 nm a l'espectrofotòmetre *Synergy HTX* (BioTek Instruments). La quantitat de GAGs es va calcular a partir de l'extrapolació dels valors d'absorbància obtinguts a 656 nm amb els valors obtinguts a partir d'una recta patró realitzada amb dilucions seriades del GAG condroitin 4-sulfat (*Glycosaminoglycan Standard*, Biocolor) del kit comercial. Tots els resultats es van normalitzar per pes de teixit humit.

2.12. Determinació del contingut de colesterol total al fetge

La determinació de colesterol total a les mostres de fetge es va dur a terme seguint el mètode d'extracció de lípids descrit per Folch (FOLCH et al., 1957). Es van pesar 100 mg de fetge, que es van homogeneïtzar amb un politró en 15 ml de cloroform-metanol (2:1). A continuació, es van afegir 3 ml de H₂SO₄ 0,05 % a cada mostra i es van agitar vigorosament els tubs. Les mostres es van deixar durant tota la nit a 4°C, per tal que se separés la fase aquosa de l'orgànica. El matí següent es va recuperar 1 ml de la fase orgànica, a la qual s'hi va afegir 1 volum de tritó X-100 1 % en cloroform, i es va deixar evaporar tot el volum de les mostres a 90°C. Seguidament, es va afegir 1 ml de cloroform als tubs, per a recuperar els lípids que s'havien quedat enganxats a la paret, i de nou es va deixar evaporar a 90°C. Aquest últim pas es va repetir un segon cop. A continuació, es va resuspendre el pellet obtingut en 0,5 ml d'H₂O Milli-Q, i les mostres es van guardar a -80°C fins al moment de processar-les.

La determinació de colesterol total es va dur a terme als extractes lipídics obtinguts del fetge amb l'analitzador *Pentra 400* (Horiba), utilitzant el kit *ABX Pentra Cholesterol CP* (Horiba).

2.13. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs de parafina

Tots els teixits dels diferents grups experimentals es van fixar durant 12-24h en formol al 4%, es van incloure en blocs de parafina i, finalment, es van fer talls histològics amb un micròtom *Leica RM2135* (Leica Biosystems). Les seccions de teixit es van desparafinar amb 2 rentats de xilol i rehidratar amb un gradient d'etanol al 100%, després al 96% i, finalment, es van deixar en PBS. Els anticossos que requerien la recuperació d'epítops, segons indicacions del fabricant, es van tractar amb tampó citrat

amb una olla a pressió. Posteriorment, es va inhibir la peroxidasa endògena amb metanol al 30 % en PBS i 1% d'H₂O₂ al 30% en PBS durant 30 min i, seguidament, es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS. Les seccions de teixits es van incubar durant tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris específics conill anti-LIMP2 i conill anti-GFAP (apartat 1.3.), es van fer 3 rentats amb PBS de 5 min i finalment es van incubar amb el corresponent anticòs secundari de cabra anti-conill IgG biotinitat (apartat 1.3.) durant 1h a temperatura ambient. El revelat es va realitzar amb el reactiu *ABC Complex* (Vector Laboratories), el qual utilitza 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com a cromogen. Les imatges en camp clar es van obtenir amb un microscopi òptic *Eclipse 90i* (Nikon Instruments).

2.14. Determinació de l'àrea positiva de les immunohistoquímiques de camp clar

La senyal positiva de les immunohistoquímiques contra LIMP2 i GFAP de l'encèfal es va quantificar en 3-4 imatges representatives (magnificació original 20x) per cada regió, mitjançant el programari *NIS Elements Advanced Research 2.20* (Nikon). Durant la quantificació, es van mantenir els mateixos paràmetres per a tots els animals. El percentatge d'àrea positiva es va calcular com l'àrea amb senyal positiva (en píxels) respecte a l'àrea total de la imatge.

2.15. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs d'OCT

Els teixits es van fixar en PFA 4% durant 12-24h. Posteriorment, es van deshidratar les mostres amb sucrosa al 30% en PBS durant 48h a 4°C, fent un canvi en la solució de sucrosa cada 24h. Els teixits es van incloure en la matriu d'inclusió M-1 (Thermo Fisher Scientific) i els blocs es van solidificar, submergint-los en isopentà refredat en N₂ líquid, i es van mantenir a -80°C fins al seu processament. Per a realitzar els talls histològics dels teixits, es van introduir al criòstat a una temperatura de -15°C per tal d'equilibrar la temperatura, i es van tallar, com a mínim, 3 seccions de 14 µm per mostra, que es van unir per contacte al portaobjectes *Superfrost Excell* (Thermo Fisher Scientific). Finalment, els talls histològics es van deixar 1 h a temperatura ambient per tal d'eixugar-se adequadament i assegurar la seva unió al portaobjectes.

Per a realitzar la tinció amb filipina, els portaobjectes amb els talls histològics es van rehidratar amb 3 rentats de PBS durant 5 minuts, es van tornar a fixar en PFA 4% durant 45 min i es van fer 3 rentats de 5 minuts en PBS. Després, es van incubar amb una solució de complex de filipina (0,05 mg/ml en PBS amb 10% FBS) a les fosques durant 2 h. Finalment, es van fer 3 rentats de 5 min en PBS i es van muntar els portaobjectes utilitzant *Vectashield* (Vector Labs), realitzant tot el procés sempre a les

fosques. Les imatges de fluorescència es van obtenir amb el microscopi *Eclipse 90i* (Nikon) amb un filtre UV.

Per a la immunohistoquímica contra GM2, els talls histològics es van deixar assecar durant 30 min, es van rehidratar amb 3 rentats de PBS 5 minuts, es van fixar les mostres amb PFA4% durant 10 min i es van tornar a fer 3 rentats de PBS de 5 min. Seguidament, es van incubar les mostres amb una solució de peròxid d'hidrogen al 30% en PBS durant 30 min. A continuació, els talls histològics es van netejar amb 3 rentats de PBS durant 5 min i es van incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs de ratolí anti-GM2 (apartat 1.3.). L'endemà es van fer tres rentats amb PBS de 5 min i finalment es van incubar amb l'anticòs secundari de cavall anti-ratolí biotinilat (apartat 1.3.). El revelat es va dur a terme amb el reactiu *ABC Complex* (Vector Laboratories). Les imatges en camp clar es van obtenir amb un microscopi òptic *Eclipse 90i* (Nikon Instruments).

2.16. Proves de comportament

2.16.1. Prova de l'Actímetre

Entre les 9h del matí i les 14h del migdia es va avaluar l'activitat locomotora i exploratòria dels ratolins. Es van situar els animals a l'interior d'una arena amb parets transparents de metacrilat de 41 x 41 x 30 cm. Els ratolins es van col·locar a la cantonada inferior dreta, mirant cap a l'exterior. Virtualment, l'arena es va subdividir en 3 zones concèntriques i equidistants: el centre (14 x 14 cm), la perifèria (27 x 27 cm) i la vora (41 x 41 cm). Durant 10 minuts, una càmera digital enregistrava el moviment dels ratolins. Els diferents paràmetres del test es van analitzar durant els tres primers minuts, menys la distància total i les línies creuades que es van analitzar durant els 10 min, amb el *software SMART v3* (Panlab) .

2.16.2. Prova del Rotarod

Per tal d'avaluar la coordinació dels ratolins, es va realitzar la prova del *rotarod* (LE 8200, Panlab). Primerament, una setmana després de la injecció, es va aclimatar els ratolins a la prova col·locant-los sobre el *rotarod* sense rotació i es va anar iniciant la rotació de forma progressiva fins que el ratolí va aprendre a caminar sobre el *rotarod*. Cada mes, durant els 6 primers mesos, i cada dos mesos des dels 6 als 12 mesos), es va realitzar la prova del *rotarod* dos dies seguits, amb 3 intents per dia. La prova consistia en situar els ratolins sobre del *rotarod* a una velocitat de 4 rpm, que s'accelerava fins a les 40 rpm durant 5 min. Es va anotar el temps que trigava cada ratolí a caure, fins a un màxim de 90 s. L'intent nul es va considerar nul, si el ratolí es girava o saltava durant la

prova. En aquests casos, es repetia de nou l'intent. Entre intents, es va deixar descansar els ratolins com a mínim 5 minuts. Per a l'anàlisi dels resultats, es va tenir en compte el valor màxim entre els 6 intents realitzats durant aquests dos dies.

2.16.3. Mesh test

Per a avaluar la coordinació i la força muscular dels ratolins, es va dur a terme el *mesh test*. Aquesta prova es va realitzar en un marc de fusta de 45 x 45 cm amb una reixa metàl·lica d'un cm de quadrícula. Els ratolins es van col·locar al centre damunt de la reixa, mirant cap a l'exterior, i es va invertir la reixa en un interval de 2 s a uns 60 cm d'altura d'una superfície encoixinada. A partir d'aquí, es va anotar el temps que trigaven a caure de la reixa, amb un temps màxim limitat a 60 s. En total es realitzaven 3 intents i es calculava la mitjana del temps de les trípliques. Entre els intents, es va deixar descansar els ratolins com a mínim 5 minuts.

2.16.4. Righting Reflex

El *righting reflex* es va utilitzar per avaluar la mobilitat i el deteriorament de la qualitat de vida dels ratolins. L'animal es va col·locar en posició supina i es va calcular el temps transcorregut fins a tenir les 4 potes en contacte amb la superfície. El test es va realitzar 3 vegades i es va deixar descansar els ratolins com a mínim 1 minut entre els intents. El temps màxim de la prova era de 10 s. Per a l'anàlisi dels resultats, es va calcular la mitjana dels 3 intents.

2.16.5. Prova del hindlimb clasping

Per tal d'avaluar la progressió de la malaltia, es va realitzar la prova del *hindlimb clasping*. En aquest test, es va agafar el ratolí a prop de la base de la cua, i se'l va aixecar i col·locar lluny dels objectes que l'envoltaven. A continuació, es va observar la posició de les seves extremitats posteriors durant 10 segons. Si les extremitats posteriors estaven desplegadas cap a l'exterior, lluny del seu abdomen, la puntuació era un 0. Si una extremitat posterior es retreia cap a l'abdomen durant més del 50% del temps, era un 1. Si les dues extremitats posteriors estaven parcialment retretes cap a l'abdomen durant més del 50% del temps, rebia una puntuació de 2. I, finalment, si les seves extremitats posteriors estaven totalment retretes i tocaven l'abdomen durant més del 50% del temps suspès, s'avaluava com un 3.

2.17. Anàlisi estadística

Tots els valors es van expressar com a la mitjana \pm SEM. Les comparacions estadístiques es van dur a terme utilitzant la prova de la *t* de Student no aparellada i de doble via quan s'estudiaven dos grups experimentals. Quan es comparaven més de dos grups experimentals amb un grup control, es va utilitzar l'anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA) seguida del post-test de *Dunnet*. Per a l'anàlisi de la supervivència amb les respectives comparacions múltiples, es va utilitzar el mètode de *Kaplan-Meier* i el test de *log-rank*. Les anàlisis estadístiques es van dur a terme amb el programa *Prism 7* (GraphPad). La significança estadística es va considerar si el valor *p* era menor a 0,05.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Ainsworth, P.J., and Coulter-Mackie, M.B. (1992). A Double Mutation in Exon 6 of the P-Hexosaminidase a Subunit in a Patient with the B I Variant of Tay-Sachs Disease. *Am. J. Hum. Genet* 51, 802–809. .
- Akalin, N., Shi, H. -P, Vavougiou, G., Hechtman, P., Lo, W., Scriver, C.R., Mahuran, D., and Kaplan, F. (1992). Novel Tay-Sachs disease mutations from China. *Hum Mutat* 1, 40–46. .
- Akerman, B.R., Zielenski, J., Triggs-Raine, B.L., Prencz, E.M., Natowicz, M.R., Lim-Steele, J.S.T., Kaback, M.M., Mules, E.H., Thomas, G.H., Clarke, J.T.R., et al. (1992). A mutation common in non-Jewish Tay-Sachs disease: frequency and RNA studies. *Hum Mutat* 1, 303–309. .
- Akli, S., Chelly, J., Mezard, C., Gandy, S., Kahn, A., and Poenaru, L. (1990). A “G” to “A” mutation at position -1 of a 5’ splice site in a late infantile form of Tay-Sachs disease. *Journal of Biological Chemistry* 265, 7324–7330. .
- Akli, S., Chelly, J., Lacorte, J.M., Poenaru, L., and Kahn, A. (1991). Seven novel Tay-Sachs mutations detected by chemical mismatch cleavage of PCR-amplified cDNA fragments. *Genomics* 11, 124–134. .
- Akli, S., Boue, J., Sandhoff, K., Kleijer, W., Vamos, E., Young, E., Gatti, R., di Natale, P., Motte, J., and Vanier, M.T. (1993a). Collaborative study of the molecular epidemiology of Tay-Sachs disease in Europe. *Eur J Hum Genet* 1, 229–238. .
- Akli, S., Chelly, J., Kahn, A., and Poenaru, L. (1993b). A null allele frequent in non-Jewish Tay-Sachs patients. *Hum Genet* 90, 614–620. .
- Akli, S., Chomel, J.C., Lacorte, J.M., Bachner, L., Axel, and Poenaru, L. (1993c). Ten novel mutations in the HEXA gene in non-Jewish Tay-Sachs patients. *Hum Mol Genet* 2, 61–67. .
- Alkan, A., Kutlu, R., Yakinci, C., Sigirci, A., Aslan, M., and Sarac, K. (2003). Infantile Sandhoff’s Disease: Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy Findings. *J Child Neurol* 18, 425–428. .
- Anheuser, S., Breiden, B., and Sandhoff, K. (2019). Ganglioside GM2 catabolism is inhibited by storage compounds of mucopolysaccharidoses and by cationic amphiphilic drugs. *Mol Genet Metab* 128, 75–83. .
- Antipova, V., Wree, A., Holzmann, C., Mann, T., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., Schmitt, O., and Hawlitschka, A. (2018). Unilateral Botulinum Neurotoxin-A Injection into

the Striatum of C57BL/6 Mice Leads to a Different Motor Behavior Compared with Rats. *Toxins (Basel)* 10, 295. .

Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K., and Öllinger, K. (2013). The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 5, 214–226. .

Arfi, A., Bourgoin, C., Basso, L., Emiliani, C., Tancini, B., Chigorno, V., Li, Y.-T., Orlacchio, A., Poenaru, L., Sonnino, S., et al. (2005). Bicistronic lentiviral vector corrects β -hexosaminidase deficiency in transduced and cross-corrected human Sandhoff fibroblasts. *Neurobiol Dis* 20, 583–593. .

Arpaia, E., Dumbrille-Ross, A., Maler, T., Neote, K., Tropak, M., Troxel, C., Stirling, J.L., Pitts, J.S., Bapat, B., Lamhonwah, A.M., et al. (1988). Identification of an altered splice site in Ashkenazi Tay-Sachs disease. *Nature* 333, 85–86. .

Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M.D. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* (1979) 149, 754–756. .

Aydin, K., Bakir, B., Tatli, B., Terzibasoglu, E., and Ozmen, M. (2005). Proton MR spectroscopy in three children with Tay-Sachs disease. *Pediatr Radiol* 35, 1081–1085. .

Ayuso, E., Mingozzi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X.M., Haurigot, V., Edmonson, S.A., Africa, L., Zhou, S., High, K.A., et al. (2010). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* 17, 503–510. .

Baek, R.C., Martin, D.R., Cox, N.R., and Seyfried, T.N. (2009). Comparative analysis of brain lipids in mice, cats, and humans with Sandhoff disease. *Lipids* 44, 197–205. .

Bainbridge, J.W.B., Mehat, M.S., Sundaram, V., Robbie, S.J., Barker, S.E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F.M., Beattie, S.G., Gardner, P.J., et al. (2015). Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine* 372, 1887–1897. .

Balakrishnan, B., and Jayandharan, G. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* 14, 86–100. .

Ballabio, A., and Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 684–696. .

- Banerjee, P., Siciliano, L., Oliveri, D., McCabe, N.R., Boyers, M.J., Horwitz, A.L., Li, S.C., and Dawson, G. (1991). Molecular basis of an adult form of beta-hexosaminidase B deficiency with motor neuron disease. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 108–115. .
- Banerjee, P., Boyers, M., ... E.B.-K.-J. of B., and 1994, undefined (1994). Preferential beta-hexosaminidase (Hex) A (alpha beta) formation in the absence of beta-Hex B (beta beta) due to heterozygous point mutations present in beta-Hex. *ASBMB* 269, 4819–4826. .
- Banisor, I., Leist, T.P., and Kalman, B. (2005). Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J Neuroinflammation* 2, 7. .
- Bapat, B., Ethier, M., Neote, K., Mahuran, D., and Gravel, R.A. (1988). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding the β -subunit of mouse β -hexosaminidase. *FEBS Lett* 237, 191–195. .
- Batista, L., Miller, F., Clave, C., Arfi, A., Douillard-Guilloux, G., Couraud, P.-O., and Caillaud, C. (2010). Induced secretion of β -hexosaminidase by human brain endothelial cells: A novel approach in Sandhoff disease? *Neurobiol Dis* 37, 656–660. .
- Bayleran, J., Hechtman, P., and Saray, W. (1984). Synthesis of 4-methylumbelliferyl-beta-D-N-acetylglucosamine-6-sulfate and its use in classification of GM2 gangliosidosis genotypes. *Clin Chim Acta* 143, 73–89. .
- Bayleran, J., Hechtman, P., Kolodny, E., and Kaback, M. (1987). Tay-Sachs disease with hexosaminidase A: characterization of the defective enzyme in two patients. *Am J Hum Genet* 41, 532. .
- Beccari, T., Hoade, J., Orlacchio, A., and Stirling, J.L. (1992). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding the α -subunit of mouse β -N-acetylhexosaminidase and comparison with the human enzyme. *Biochemical Journal* 285, 593–596. .
- Beegle, J., Hendrix, K., Maciel, H., Nolta, J.A., and Anderson, J.S. (2020). Improvement of motor and behavioral activity in Sandhoff mice transplanted with human CD34+ cells transduced with a HexA/HexB expressing lentiviral vector. *J Gene Med* 22. .
- Bembi, B., Marchetti, F., Guerci, V.I., Ciana, G., Addobbati, R., Grasso, D., Barone, R., Cariati, R., Fernandez-Guillen, L., Butters, T., et al. (2006). Substrate reduction therapy in the infantile form of Tay-Sachs disease. *Neurology* 66, 278–280. .
- Bertoni, C., Li, Y.T., and Li, S.C. (1999). Catabolism of asialo-GM2 in man and mouse. Specificity of human/mouse chimeric GM2 activator proteins. *J Biol Chem* 274, 28612–28618. .

Biffi, A. (2017). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Storage Disease: Current and New Indications. *Mol Ther* 25, 1155–1162. .

Bikker, H., van den Berg, F.M., Wolterman, R.A., Kleijer, W.J., de Vijlder, J.J.M., and Bolhuis, P.A. (1990). Distribution and characterization of a Sandhoff disease-associated 50-kb deletion in the gene encoding the human beta-hexosaminidase beta-chain. *Hum Genet* 85, 327–329. .

Binny, C., McIntosh, J., della Peruta, M., Kymalainen, H., Tuddenham, E.G.D., Buckley, S.M.K., Waddington, S.N., McVey, J.H., Spence, Y., Morton, C.L., et al. (2012). AAV-mediated gene transfer in the perinatal period results in expression of FVII at levels that protect against fatal spontaneous hemorrhage. *Blood* 119, 957–966. .

Bisel, B., Pavone, F.S., and Calamai, M. (2014). GM1 and GM2 gangliosides: Recent developments. *Biomol Concepts* 5, 87–93. .

Bley, A.E., Giannikopoulos, O.A., Hayden, D., Kubilus, K., Tifft, C.J., and Eichler, F.S. (2011). Natural History of Infantile GM2 Gangliosidosis. *Pediatrics* 128, e1233–e1241. .

Boado, R.J., Ka-Wai Hui, E., Zhiqiang Lu, J., and Pardridge, W.M. (2014a). Insulin receptor antibody-iduronate 2-sulfatase fusion protein: Pharmacokinetics, anti-drug antibody, and safety pharmacology in Rhesus monkeys. *Biotechnol Bioeng* 111, 2317–2325. .

Boado, R.J., Lu, J.Z., Hui, E.K.-W., and Pardridge, W.M. (2014b). Insulin Receptor Antibody–Sulfamidase Fusion Protein Penetrates the Primate Blood–Brain Barrier and Reduces Glycosaminoglycans in Sanfilippo Type A Cells. *Mol Pharm* 11, 2928–2934. .

Boado, R.J., Lu, J.Z., Hui, E.K.-W., Lin, H., and Pardridge, W.M. (2016). Insulin Receptor Antibody– α -N-Acetylglucosaminidase Fusion Protein Penetrates the Primate Blood–Brain Barrier and Reduces Glycosaminoglycans in Sanfilippo Type B Fibroblasts. *Mol Pharm* 13, 1385–1392. .

Boado, R.J., Lu, J.Z., Hui, E.K.W., Lin, H., and Pardridge, W.M. (2019). Bi-functional IgG-lysosomal enzyme fusion proteins for brain drug delivery. *Sci Rep* 9. .

Bolhuis, P.A., Oonk, J.G.W., Kamp, P.E., Ris, A.J., Michalski, J.C., Overdijk, B., and Reuser, A.J.J. (1987). Ganglioside storage, hexosaminidase lability, and urinary oligosaccharides in adult Sandhoff's disease. *Neurology* 37, 75–81. .

Bolhuis, P.A., Ponne, N.J., Bikker, H., Baas, F., and de Jong, J.M.B.V. (1993). Molecular basis of an adult form of Sandhoff disease: substitution of glutamine for arginine at

position 505 of the beta-chain of beta-hexosaminidase results in a labile enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1182, 142–146. .

Bosch, M.E., and Kielian, T. (2015). Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. *Front Neurosci* 9. .

Bourgoin, C., Emiliani, C., Kremer, E.J., Gelot, A., Tancini, B., Gravel, R.A., Drugan, C., Orlacchio, A., Poenaru, L., and Caillaud, C. (2003). Widespread distribution of β -hexosaminidase activity in the brain of a Sandhoff mouse model after coinjection of adenoviral vector and mannitol. *Gene Ther* 10, 1841–1849. .

Boustany, R.-M., Al-Shareef, I., and El-Haddad, S. (2013). Sphingolipid Disorders and the Neuronal Ceroid Lipofuscinoses or Batten Disease (Wolman Disease, Cholesteryl Ester Storage Disease, and Cerebrotendinous Xanthomatosis). In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, (Elsevier), pp. 1–85.

Boustany, R.N., Tanaka, A., Nishimoto, J., and Suzuki, K. (1991). Genetic cause of a juvenile form of Tay-Sachs disease in a Lebanese child. *Ann Neurol* 29, 104–107. .

Boyd, R.E., Lee, G., Rybczynski, P., Benjamin, E.R., Khanna, R., Wustman, B.A., and Valenzano, K.J. (2013). Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. *J Med Chem* 56, 2705–2725. .

Bradbury, A.M., Morrison, N.E., Hwang, M., Cox, N.R., Baker, H.J., and Martin, D.R. (2009). Neurodegenerative lysosomal storage disease in European Burmese cats with hexosaminidase beta-subunit deficiency. *Mol Genet Metab* 97, 53–59. .

Bradbury, A.M., Cochran, J.N., McCurdy, V.J., Johnson, A.K., Brunson, B.L., Gray-Edwards, H., Leroy, S.G., Hwang, M., Randle, A.N., Jackson, L.S., et al. (2013). Therapeutic Response in Feline Sandhoff Disease Despite Immunity to Intracranial Gene Therapy. *Molecular Therapy* 21, 1306–1315. .

Bradbury, A.M., Gray-Edwards, H.L., Shirley, J.L., McCurdy, V.J., Colaco, A.N., Randle, A.N., Christopherson, P.W., Bird, A.C., Johnson, A.K., Wilson, D.U., et al. (2015). Biomarkers for disease progression and AAV therapeutic efficacy in feline Sandhoff disease. *Exp Neurol* 263, 102–112. .

Bradbury, A.M., Peterson, T.A., Gross, A.L., Wells, S.Z., McCurdy, V.J., Wolfe, K.G., Dennis, J.C., Brunson, B.L., Gray-Edwards, H., Randle, A.N., et al. (2017). AAV-mediated gene delivery attenuates neuroinflammation in feline Sandhoff disease. *Neuroscience* 340, 117–125. .

- Braulke, T., and Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1793, 605–614. .
- Breiden, B., and Sandhoff, K. (2019). Lysosomal Glycosphingolipid Storage Diseases. *Annu Rev Biochem* 88, 461–485. .
- Brown, C.A., McInnes, B., Dodelson de Kremer, R., and Mahuran, D.J. (1992). Characterization of two HEXB gene mutations in Argentinean patients with Sandhoff disease. *Biochim Biophys Acta* 1180, 91–98. .
- Brown, D.H., Triggs-Raine, B.L., McGinniss, M.J., and Kaback, M.M. (1995). A novel mutation at the invariant acceptor splice site of intron 9 in the HEXA gene [IVS9-1 G→T] detected by a PCR-based diagnostic test. *Hum Mutat* 5, 173–174. .
- Buchlis, G., Podsakoff, G.M., Radu, A., Hawk, S.M., Flake, A.W., Mingozi, F., and High, K.A. (2012). Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood* 119, 3038–3041. .
- Büning, H., Ried, M.U., Perabo, L., Gerner, F.M., Huttner, N.A., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 10, 1142–1151. .
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *Journal of Gene Medicine* 10. .
- Cachón-González, M., Wang, S.Z., McNair, R., Bradley, J., Lunn, D., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2012). Gene transfer corrects acute GM2 gangliosidosis--potential therapeutic contribution of perivascular enzyme flow. *Mol Ther* 20, 1489–1500. .
- Cachón-González, M.B., Wang, S.Z., Lynch, A., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2006). Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 10373–10378. .
- Cachón-González, M.-B., Wang, S.Z., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2014). Reversibility of neuropathology in Tay–Sachs-related diseases. *Hum Mol Genet* 23, 730–748. .
- Cachon-Gonzalez, M.B., Zaccariotto, E., and Cox, T.M. (2018). Genetics and Therapies for GM2 Gangliosidosis. *Curr Gene Ther* 18. .
- Cao, Z., Natowicz, M.R., Kabacko, M.M., Lim-Steele, J.S.T., Prence, E.M., Brown, D., Chabot, T., and Triggs-Raine, B.L. (1993). A Second Mutation Associated with Apparent

B--Hexosaminidase A Pseudodeficiency: Identification and Frequency Estimation. *Am. J. Hum. Genet* 53, 1198–1205. .

Carvalho, M., Sepodes, B., and Martins, A.P. (2021). Patient access to gene therapy medicinal products: a comprehensive review. *BMJ Innov* 7, 123–134. .

Chen, X., Zaro, J.L., and Shen, W.-C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1357–1369. .

Chen, Y., Jian, J., Hettinghouse, A., Zhao, X., Setchell, K.D.R., Sun, Y., and Liu, C. ju (2018). Progranulin associates with hexosaminidase A and ameliorates GM2 ganglioside accumulation and lysosomal storage in Tay-Sachs disease. *J Mol Med (Berl)* 96, 1359–1373. .

Chira, S., Jackson, C.S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M.S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L.Z., Calin, G.A., and Berindan-Neagoe, I. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget* 6, 30675–30703. .

Chow, G.C.S., Clarke, J.T.R., and Banwell, B.L. (2001). Late-Onset GM2 gangliosidosis presenting as burning dysesthesias. *Pediatr Neurol* 25, 59–61. .

Clarke, J.T.R., Mahuran, D.J., Sathe, S., Kolodny, E.H., Rigat, B.A., Raiman, J.A., and Tropak, M.B. (2011). An open-label Phase I/II clinical trial of pyrimethamine for the treatment of patients affected with chronic GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs or Sandhoff variants). *Mol Genet Metab* 102, 6–12. .

Cohen-Tannoudji, M., Marchand, P., Akli, S., Sheardown, S.A., Puech, J.P., Kress, C., Gressens, P., Nassogne, M.C., Beccari, T., Muggleton-Harris, A.L., et al. (1995). Disruption of murine Hexa gene leads to enzymatic deficiency and to neuronal lysosomal storage, similar to that observed in Tay-Sachs disease. *Mammalian Genome* 6, 844–849. .

Conzelmann, E., Sandhoff, K., Nehr Korn, H., Geiger, B., and Arnon, R. (1978). Purification, Biochemical and Immunological Characterisation of Hexosaminidase A from Variant AB of Infantile GM2 Gangliosidosis. *Wiley Online Library* 84, 27–33. .

Cork, L.C., Munnell, J.F., Lorenz, M.D., Murphy, J. v., Baker, H.J., and Rattazzi, M.C. (1977). GM2 ganglioside lysosomal storage disease in cats with beta-hexosaminidase deficiency. *Science* 196, 1014–1017. .

Cork, L.C., Munnell, J.F., and Lorenz, M.D. (1978). The pathology of feline GM2 gangliosidosis. *Am J Pathol* 90, 723–734. .

Corthorn, J., Cantin, M., and Thibault, G. (1991). Rat atrial secretory granules and pro-ANF processing enzyme. *Mol Cell Biochem* 103, 31–39. .

Darios, F., and Stevanin, G. (2020). Impairment of Lysosome Function and Autophagy in Rare Neurodegenerative Diseases. *J Mol Biol* 432, 2714. .

Davidoff, A.M., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Spence, Y., and Nathwani, A.C. (2003). Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 102, 480–488. .

D'azzos, A., Proias, R.L., Kolodnysn, E.H., Kabackll, M.M., and Neufelds, E.F. (1984). Faulty association of alpha- and beta-subunits in some forms of beta-hexosaminidase A deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 259, 11070–11074. .

Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W.O., Wahl, A., Garcia, J.V., Reichenspurner, H., et al. (2019). Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol* 37, 252–258. .

Dlott, B., D'Azzo, A., Quon, D.V.K., and Neufeld, E.F. (1990). Two mutations produce intron insertion in mRNA and elongated beta-subunit of human beta-hexosaminidase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 17921–17927. .

Domingues, H.S., Portugal, C.C., Socodato, R., and Relvas, J.B. (2016). Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol* 4. .

Donsante, A., Miller, D.G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E.M., Russell, D.W., and Sands, M.S. (2007). AAV Vector Integration Sites in Mouse Hepatocellular Carcinoma. *Science* (1979) 317, 477–477. .

Dreyfus, J.C., Poenaru, L., Vibert, M., Ravise, N., and Boue, J. (1977). Characterization of a variant of beta-hexosaminidase: "hexosaminidase Paris". *Am J Hum Genet* 29, 287. .

Drucker, L., and Navon, R. (1993). Tay-Sachs disease in an Israeli Arab family: Trp26-->stop in the alpha-subunit of hexosaminidase A. *Hum Mutat* 2, 415–417. .

Drucker, L., Proia, R.L., and Navon, R. (1992). Identification and rapid detection of three Tay-Sachs mutations in the Moroccan Jewish population. *Am J Hum Genet* 51, 371. .

- de Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal* 60, 604. .
- Edelmann, M.J., and Maegawa, G.H.B. (2020). CNS-Targeting Therapies for Lysosomal Storage Diseases: Current Advances and Challenges. *Front Mol Biosci* 7. .
- Fajardo-Serrano, A., Rico, A.J., Roda, E., Honrubia, A., Arrieta, S., Ariznabarreta, G., Chocarro, J., Lorenzo-Ramos, E., Pejenaute, A., Vázquez, A., et al. (2022). Adeno-Associated Viral Vectors as Versatile Tools for Neurological Disorders: Focus on Delivery Routes and Therapeutic Perspectives. *Biomedicines* 10, 746. .
- Federico, A., Palmeri, S., Malandrini, A., and Fabrizi, G. (1991). The clinical aspects of adult hexosaminidase deficiencies. *Dev Neurosci* 13, 280–287. .
- Fernandes, M., Kaplan, F., Natowicz, M., Prence, E., Kolodny, E., Kaback, M., and Hachtman, P. (1992). A new Tay-Sachs disease B1 allele in exon 7 in two compound heterozygotes each with a second novel mutation. *Hum Mol Genet* 1, 759–761. .
- Ferreira, C.R., and Gahl, W.A. (2017). Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis* 2, 1–71. .
- Fitterer, B., Hall, P., Antonishyn, N., Desikan, R., Gelb, M., and Lehotay, D. (2014). Incidence and carrier frequency of Sandhoff disease in Saskatchewan determined using a novel substrate with detection by tandem mass spectrometry and molecular genetic analysis. *Mol Genet Metab* 111, 382–389. .
- Flotte, T.R., Cataltepe, O., Puri, A., Batista, A.R., Moser, R., McKenna-Yasek, D., Douthwright, C., Gernoux, G., Blackwood, M., Mueller, C., et al. (2022). AAV gene therapy for Tay-Sachs disease. *Nat Med* 28, 251–259. .
- Fukumizu, M., Yoshikawa, H., Takashima, S., Sakuragawa, N., and Kurokawa, T. (1992). Tay-Sachs disease: progression of changes on neuroimaging in four cases. *Neuroradiology* 34, 483–486. .
- Garbade, S.F., Zielonka, M., Mechler, K., Kölker, S., Hoffmann, G.F., Staufner, C., Mengel, E., and Ries, M. (2020). FDA orphan drug designations for lysosomal storage disorders - a cross-sectional analysis. *PLoS One* 15. .
- de Gasperi, R., Gama Sosa, M.A., Grebner, E.E., Mansfield, D., Battistini, S., Sartorato, E.L., Raghavan, S.S., Davis, J.G., and Kolodny, E.H. (1995). Substitution of alanine543 with a threonine residue at the carboxy terminal end of the beta-chain is associated with

thermolabile hexosaminidase B in a Jewish family of Oriental ancestry. *Biochem Mol Med* 56, 31–36. .

de Gasperi, R., Gama Sosa, M.A., Battistini, S., Yeretsian, J., Raghavan, S., Zelnik, N., Leshinsky, E., and Kolodny, E.H. (1996). Late-onset GM2 gangliosidosis: Ashkenazi Jewish family with an exon 5 mutation (Tyr180-->His) in the Hex A alpha-chain gene. *Neurology* 47, 547–552. .

George, L.A., Ragni, M. v., Rasko, J.E.J., Raffini, L.J., Samelson-Jones, B.J., Ozelo, M., Hazbon, M., Runowski, A.R., Wellman, J.A., Wachtel, K., et al. (2020). Long-Term Follow-Up of the First in Human Intravascular Delivery of AAV for Gene Transfer: AAV2-hFIX16 for Severe Hemophilia B. *Molecular Therapy* 28, 2073–2082. .

Ghosh, P., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 202–213. .

Ginzburg, L., Li, S.C., Li, Y.T., and Futerman, A.H. (2008). An exposed carboxyl group on sialic acid is essential for gangliosides to inhibit calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: relevance to gangliosidoses. *J Neurochem* 104, 140–146. .

Giugliani, R., Vairo, F., Kubaski, F., Poswar, F., Riegel, M., Baldo, G., and Saute, J.A. (2018). Neurological manifestations of lysosomal disorders and emerging therapies targeting the CNS. *Lancet Child Adolesc Health* 2, 56–68. .

Gleitz, H.F., Liao, A.Y., Cook, J.R., Rowston, S.F., Forte, G.M., D'Souza, Z., O'Leary, C., Holley, R.J., and Bigger, B.W. (2018). Brain-targeted stem cell gene therapy corrects mucopolysaccharidosis type II via multiple mechanisms. *EMBO Mol Med* 10. .

Golebiowski, D., van der Bom, I.M.J., Kwon, C.-S., Miller, A.D., Petrosky, K., Bradbury, A.M., Maitland, S., Kühn, A.L., Bishop, N., Curran, E., et al. (2017). Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum Gene Ther* 28, 510–522. .

Gomez-Lira, M., Sangalli, A., Mottes, M., Perusi, C., Pignatti, P.F., Rizzuto, N., and Salviati, A. (1995). A common beta hexosaminidase gene mutation in adult Sandhoff disease patients. *Hum Genet* 96, 417–422. .

Gomez-Lira, M., Perusi, C., Brutti, N., Farnetani, M.A., Margollicci, M.A., Rizzuto, N., Pignatti, P.F., and Salviati, A. (1995). A 48-bp insertion between exon 13 and 14 of the HEXB gene causes infantile-onset Sandhoff disease. *Hum Mutat* 6, 260–262. .

- Gordon, B.A., Gordon, K.E., Hinton, G.G., Cadera, W., Feleki, V., Bayleran, J., and Hechtman, P. (1988). Tay-Sachs disease: B1 variant. *Pediatr Neurol* 4, 54–57. .
- Gray, S.J., Foti, S.B., Schwartz, J.W., Bachaboina, L., Taylor-Blake, B., Coleman, J., Ehlers, M.D., Zylka, M.J., McCown, T.J., and Samulski, R.J. (2011). Optimizing Promoters for Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in the Peripheral and Central Nervous System Using Self-Complementary Vectors. *Hum Gene Ther* 22, 1143–1153. .
- Gray-Edwards, H.L., Brunson, B.L., Holland, M., Hespel, A.M., Bradbury, A.M., McCurdy, V.J., Beadlescomb, P.M., Randle, A.N., Salibi, N., Denney, T.S., et al. (2015). Mucopolysaccharidosis-like phenotype in feline Sandhoff disease and partial correction after AAV gene therapy. *Mol Genet Metab* 116, 80–87. .
- Gray-Edwards, H.L., Randle, A.N., Maitland, S.A., Benatti, H.R., Hubbard, S.M., Canning, P.F., Vogel, M.B., Brunson, B.L., Hwang, M., Ellis, L.E., et al. (2018). Adeno-Associated Virus Gene Therapy in a Sheep Model of Tay–Sachs Disease. *Hum Gene Ther* 29, 312–326. .
- Grebner, E.E., and Tomczak, J. (1991). Distribution of three alpha-chain beta-hexosaminidase A mutations among Tay-Sachs carriers. *Am J Hum Genet* 48, 604. .
- Greer, J.M., and Lees, M.B. (2002). Myelin proteolipid protein—the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 211–215. .
- Grimm, D., Lee, J.S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T.A., and Kay, M.A. (2008). In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J Virol* 82, 5887–5911. .
- Guidotti, J. (1998). Retrovirus-mediated enzymatic correction of Tay-Sachs defect in transduced and non-transduced cells. *Hum Mol Genet* 7, 831–838. .
- Guidotti, J.E., Mignon, A., Haase, G., Caillaud, C., McDonnell, N., Kahn, A., and Poenaru, L. (1999). Adenoviral Gene Therapy of the Tay-Sachs Disease in Hexosaminidase A-Deficient Knock-Out Mice. *Hum Mol Genet* 8, 831–838. .
- Guyenet, S.J., Furrer, S.A., Damian, V.M., Baughan, T.D., la Spada, A.R., and Garden, G.A. (2010). A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J Vis Exp*. .
- Hall, P., Minnich, S., Teigen, C., and Raymond, K. (2014). Diagnosing Lysosomal Storage Disorders: The GM2 Gangliosidoses. *Curr Protoc Hum Genet* 83, 17.16.1-17.16.8. .

- Han, X., Wang, M., Duan, S., Franco, P.J., Kenty, J.H.R., Hedrick, P., Xia, Y., Allen, A., Ferreira, L.M.R., Strominger, J.L., et al. (2019). Generation of hypoinmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 10441–10446. .
- Hara, Y., Ioannou, P., Drousiotou, A., Stylianidou, G., Anastasiadou, V., and Suzuki, K. (1994). Mutation analysis of a Sandhoff disease patient in the Maronite community in Cyprus. *Hum Genet* 94, 136–140. .
- Harmon, D.L., Gardner-Medwin, D., and Stirling, J.L. (1993). Two new mutations in a late infantile Tay-Sachs patient are both in exon 1 of the beta-hexosaminidase alpha subunit gene. *J Med Genet* 30, 123–128. .
- Hasegawa, D., Yamato, O., Kobayashi, M., Fujita, M., Nakamura, S., Takahashi, K., Satoh, H., Shoda, T., Hayashi, D., Yamasaki, M., et al. (2007). Clinical and molecular analysis of GM2 gangliosidosis in two apparent littermate kittens of the Japanese domestic cat. *J Feline Med Surg* 9, 232–237. .
- Hasilik, A., and Neufeldg, E.F. (1980). Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *J Biol Chem* 4946–4950. .
- Hatzimichael, E., and Tuthill, M. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning* 3, 105–117. .
- Haurigot, V., and Bosch, F. (2013a). Toward a gene therapy for neurological and somatic MPSIIIA. *Rare Diseases* 1, e27209. .
- Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013b). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J Clin Invest* 123, 3254–3271. .
- Hayase, T., Shimizu, J., Goto, T., Nozaki, Y., Mori, M., Takahashi, N., Namba, E., Yamagata, T., and Momoi, M.Y. (2010). Unilaterally and rapidly progressing white matter lesion and elevated cytokines in a patient with Tay–Sachs disease. *Brain Dev* 32, 244–247. .
- Hechtman, P., Boulay, B., Bayleran, J., and Andermann, E. (1989). The mutation mechanism causing juvenile-onset Tay-Sachs disease among Lebanese. *Clin Genet* 35, 364–375. .
- Hechtman, P., Kaplan, F., Bayleran, J., Boulay, B., Andermann, E., de Braekeleer, M., Melancon, S., Lambert, M., Potier, M., Gagne, R., et al. (1990). More than one mutant

allele causes infantile Tay-Sachs disease in French-Canadians. *Am J Hum Genet* 47, 815. .

Hechtman, P., Boulay, B., de Braekeleer, M., Andermann, E., Melançon, S., Laroche, J., Prevost, C., and Kaplan, F. (1992). The intron 7 donor splice site transition: a second Tay-Sachs disease mutation in French Canada. *Hum Genet* 90, 402–406. .

Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., and Wilson, J.M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum Gene Ther* 29, 285–298. .

Hobbs, J.R., Barrett, A.J., Chambers, D., James, D.C.O., Hugh-Jones, K., Byrom, N., Henry, K., Lucas, C.F., Rogers, T.R., Benson, P.F., et al. (1981). Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 2, 709–712. .

Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., and Rowe, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 1467. .

Hordeaux, J., Dubreil, L., Robveille, C., Deniaud, J., Pascal, Q., Dequéant, B., Pailloux, J., Lagalice, L., Ledevin, M., Babarit, C., et al. (2017). Long-term neurologic and cardiac correction by intrathecal gene therapy in Pompe disease. *Acta Neuropathol Commun* 5, 66. .

Hou, Y., Vavougios, G., Hinek, A., Kui, W., Wu, K., Hechtman, P., Kaplan, F., and Mahuran, D.J. (1996). The Val⁹²Leu Mutation in the α -Subunit of p-Hexosaminidase A Is Not Associated with the B1-Variant Form of Tay-Sachs Disease. *Am. J. Hum. Genet* 59, 52–58. .

Hu, H., Tian, M., Ding, C., and Yu, S. (2019). The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol* 9. .

Huang, J.Q., Trasler, J.M., Igdoura, S., Michaud, J., Hanai, N., and Gravel, R.A. (1997). Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet* 6, 1879–1885. .

Jacobs, J.F.M., Willemsen, M.A.A.P., Groot-Loonen, J.J., Wevers, R.A., and Hoogerbrugge, P.M. (2005). Allogeneic BMT followed by substrate reduction therapy in a child with subacute Tay-Sachs disease. *Bone Marrow Transplant* 36, 925–926. .

Jarnes Utz, J.R., Kim, S., King, K., Ziegler, R., Schema, L., Redtree, E.S., and Whitley, C.B. (2017). Infantile gangliosidoses: Mapping a timeline of clinical changes. *Mol Genet Metab* 121, 170–179. .

Jeyakumar, M., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (1999). Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with *N*-butyldeoxynojirimycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6388–6393. .

Jeyakumar, M., Smith, D., Elliott-Smith, E., Cortina-Borja, M., Reinkensmeier, G., Butters, T.D., Lemm, T., Sandhoff, K., Perry, V.H., Dwek, R.A., et al. (2002). An Inducible Mouse Model of Late Onset Tay–Sachs Disease. *Neurobiol Dis* 10, 201–210. .

Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., van der Spoel, A.C., D’Azzo, A., Perry, V.H., Butters, T.D., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126, 974–987. .

Jeyakumar, M., Williams, I., Smith, D.A., Cox, T.M., and Platt, F.M. (2009). Critical role of iron in the pathogenesis of the murine gangliosidoses. *Neurobiol Dis* 34, 406–416. .

Jian, J., Tian, Q.-Y., Hettinghouse, A., Zhao, S., Liu, H., Wei, J., Grunig, G., Zhang, W., Setchell, K.D.R., Sun, Y., et al. (2016). Progranulin Recruits HSP70 to β -Glucocerebrosidase and Is Therapeutic Against Gaucher Disease. *EBioMedicine* 13, 212–224. .

Johnson, W.G. (1981). The clinical spectrum of hexosaminidase deficiency diseases. *Neurology* 31, 1453–1456. .

Johnson, W.G., Desnick, R.J., Long, D.M., Sharp, H.L., Krivit, W., Brady, B., and Brady, R.O. (1973). Intravenous injection of purified hexosaminidase A into a patient with Tay-Sachs disease. *Birth Defects Orig Artic Ser* 9, 120–124. .

Kaback, M.M., and Desnick, R.J. (2001). Tay-Sachs Disease: From Clinical Description to Molecular Defect. *Adv Genet* 44:1-9. .

Kaback, M., Lim Steele, J., Dabholkar, D., Brown, D., Levy, N., and Zeiger, K. (1993). Tay-Sachs Disease— Carrier Screening, Prenatal Diagnosis, and the Molecular Era: An International Perspective, 1970 to 1993. *JAMA* 270, 2307–2315. .

Kaback, M.M., Zeiger, R.S., Reynolds, L.W., and Sonneborn, M. (1974). Approaches to the control and prevention of Tay-Sachs disease. *Prog Med Genet* 10, 103–134. .

- Kanae, Y., Endoh, D., Yamato, O., Hayashi, D., Matsunaga, S., Ogawa, H., Maede, Y., and Hayashi, M. (2007). Nonsense mutation of feline beta-hexosaminidase beta-subunit (HEXB) gene causing Sandhoff disease in a family of Japanese domestic cats. *Res Vet Sci* 82, 54–60. .
- Karumuthil-Melethil, S., Nagabhushan Kalburgi, S., Thompson, P., Tropak, M., Kaytor, M.D., Keimel, J.G., Mark, B.L., Mahuran, D., Walia, J.S., and Gray, S.J. (2016). Novel Vector Design and Hexosaminidase Variant Enabling Self-Complementary Adeno-Associated Virus for the Treatment of Tay-Sachs Disease. *Hum Gene Ther* 27, 509–521. .
- Kato, A., Nakagome, I., Nakagawa, S., Kinami, K., Adachi, I., Jenkinson, S.F., Désiré, J., Blériot, Y., Nash, R.J., Fleet, G.W.J., et al. (2017). In silico analyses of essential interactions of iminosugars with the Hex A active site and evaluation of their pharmacological chaperone effects for Tay-Sachs disease. *Org Biomol Chem* 15, 9297–9304. .
- Kim, S.T., Son, H.J., Choi, J.H., Ji, I.J., and Hwang, O. (2010). Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1306, 176–183. .
- Kleiman, F.E., de Kremer, R.D., de Ramirez, A.O., Gravel, R.A., and Argaraña, C.E. (1994). Sandhoff disease in Argentina: high frequency of a splice site mutation in the HEXB gene and correlation between enzyme and DNA-based tests for heterozygote detection. *Hum Genet* 94, 279–282. .
- Kodama, T., Togawa, T., Tsukimura, T., Kawashima, I., Matsuoka, K., Kitakaze, K., Tsuji, D., Itoh, K., Ishida, Y. ichi, Suzuki, M., et al. (2011). Lyso-GM2 ganglioside: a possible biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. *PLoS One* 6. .
- Kolter, T. (2012). Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochem* 2012, 1–36. .
- Kolter, T., and Sandhoff, K. (1998). Glycosphingolipid degradation and animal models of GM2-gangliosidoses. In *Journal of Inherited Metabolic Disease*, pp. 548–563.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884. .
- Kot, S., Karumuthil-Melethil, S., Woodley, E., Zaric, V., Thompson, P., Chen, Z., Lykken, E., Keimel, J.G., Kaemmerer, W.F., Gray, S.J., et al. (2021). Investigating Immune

Responses to the scAAV9-HEXM Gene Therapy Treatment in Tay–Sachs Disease and Sandhoff Disease Mouse Models. *Int J Mol Sci* 22, 6751. .

Kotterman, M.A., and Schaffer, D. v. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* 15, 445–451. .

Kremer, R. de, Boldini, C. de, Capra, P., Veritier, P., Goldenhersch, H., Corbella, L., Sembaj, A., Martín, S., Kremer, I., and Mass, L. (1987). Estimation of heterozygote frequency of Sandhoff disease in a high-risk Argentinian population. Predictive assignment of the genotype through statistical analysis. *Medicina (B Aires)* 455–463. .

Kremer, R.D., Boldini, C.D., Capra, A.P., Levstein, I.M., Bainttein, N., Hidalgo, P.K., and Hliba, H. (1985). Sandhoff disease: 36 cases from Cordoba, Argentina. *J Inherit Metab Dis* 8, 46. .

Kuroki, Y., Itoh, K., Nadaoka, Y., Tanaka, T., and Sakuraba, H. (1995). A novel missense mutation (C522Y) is present in the beta-hexosaminidase beta-subunit gene of a Japanese patient with infantile Sandhoff disease. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 564–571. .

Kytzia, H., Hinrichs, U., Maire, I., Suzuki, K., Sandhoff, K., Bouvier, S., cedex, L., and Saul Korey, -The R (1983). Variant of GM2-gangliosidosis with hexosaminidase A having a severely changed substrate specificity. *EMBO J.* 2, 1201–1205. .

Lahey, H.G., Webber, C.J., Golebiowski, D., Izzo, C.M., Horn, E., Taghian, T., Rodriguez, P., Batista, A.R., Ellis, L.E., Hwang, M., et al. (2020). Pronounced Therapeutic Benefit of a Single Bidirectional AAV Vector Administered Systemically in Sandhoff Mice. *Mol Ther* 28, 2150–2160. .

Lalonde, R., and Strazielle, C. (2011). Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Res Rev* 67, 252–259. .

Landels, E.C., Green, P.M., Ellis, I.H., Fensom, A.H., and Bobrow, M. (1992). Beta-hexosaminidase splice site mutation has a high frequency among non-Jewish Tay-Sachs disease carriers from the British Isles. *J Med Genet* 29, 563–567. .

Landels, E.C., Green, P.M., Ellis, I.H., Fensom, A.H., Kaback, M.M., Lim-Steele, J., Zeiger, K., Levy, N., and Bobrow, M. (1993). Further investigation of the HEXA gene intron 9 donor splice site mutation frequently found in non-Jewish Tay-Sachs disease patients from the British Isles. *J Med Genet* 30, 479–481. .

- Lau, M.M.H., and Neufelds, E.F. (1989). A frameshift mutation in a patient with Tay-Sachs disease causes premature termination and defective intracellular transport of the α -subunit of β -hexosaminidase. *Journal of Biological Chemistry* 264, 21376–21380. .
- Lawrence, R.E., and Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat Cell Biol* 21, 133–142. .
- Lawson, C.A., and Martin, D.R. (2016). Animal models of GM2 gangliosidosis: Utility and limitations. *Application of Clinical Genetics* 9, 111–120. .
- Leal, A.F., Benincore-Flórez, E., Solano-Galarza, D., Jaramillo, R.G.G., Echeverri-Peña, O.Y., Suarez, D.A., Alméciga-Díaz, C.J., and Espejo-Mojica, A.J. (2020). Gm2 gangliosidoses: Clinical features, pathophysiological aspects, and current therapies. *Int J Mol Sci* 21, 1–27. .
- Lemieux, M.J., Mark, B.L., Cherney, M.M., Withers, S.G., Mahuran, D.J., and James, M.N.G. (2006). Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *J Mol Biol* 359, 913–929. .
- Lentz, T.B., Gray, S.J., and Samulski, R.J. (2012). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol Dis* 48, 179–188. .
- Lew, R.M., Burnett, L., Proos, A.L., and Delatycki, M.B. (2015). Tay-Sachs disease: current perspectives from Australia. *Appl Clin Genet* 8, 19. .
- Li, M. (2018). Enzyme Replacement Therapy: A Review and Its Role in Treating Lysosomal Storage Diseases. *Pediatr Ann* 47, e191–e197. .
- Liguori, L., Monticelli, M., Allocca, M., Mele, B.H., Lukas, J., Cubellis, M.V., and Andreotti, G. (2020). Pharmacological Chaperones: A Therapeutic Approach for Diseases Caused by Destabilizing Missense Mutations. *Int J Mol Sci* 21. .
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 24, 59–67. .
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J.B.J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Ruth Vaseghi, H., Qian, L., and Liu, J. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep* 7, 2193. .
- Luzio, J.P., Hackmann, Y., Dieckmann, N.M.G., and Griffiths, G.M. (2014). The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6. .

Lykken, E.A., Shyng, C., Edwards, R.J., Rozenberg, A., and Gray, S.J. (2018). Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J Neurodev Disord* 10, 16. .

Maegawa, G. (2012). GM2 gangliosidosis: the prototype of lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol* 54, 104–105. .

Maegawa, G.H.B., Stockley, T., Tropak, M., Banwell, B., Blaser, S., Kok, F., Giugliani, R., Mahuran, D., and Clarke, J.T.R. (2006). The natural history of juvenile or subacute GM2 gangliosidosis: 21 new cases and literature review of 134 previously reported. *Pediatrics* 118. .

Maegawa, G.H.B., Tropak, M., Buttner, J., Stockley, T., Kok, F., Clarke, J.T.R., and Mahuran, D.J. (2007). Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J Biol Chem* 282, 9150–9161. .

Maegawa, G.H.B., Banwell, B.L., Blaser, S., Sorge, G., Toplak, M., Ackerley, C., Hawkins, C., Hayes, J., and Clarke, J.T.R. (2009). Substrate reduction therapy in juvenile GM2 gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 98, 215–224. .

Mahuran, D.J. (1991). The biochemistry of HEXA and HEXB gene mutations causing GM2 gangliosidosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 87–94. .

Mahuran, D.J. (1999). Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochim Biophys Acta* 1455, 105–138. .

Mahuran, D.J., Neote, K., Klavins, M.H., Leung, A., and Gravel, R.A. (1988). Proteolytic processing of pro-alpha and pro-beta precursors from human beta-hexosaminidase. Generation of the mature alpha and beta a beta b subunits. *J Biol Chem* 263, 4612–4618. .

Makrypidi, G., Damme, M., Muller-Loennies, S., Trusch, M., Schmidt, B., Schluter, H., Heeren, J., Lubke, T., Saftig, P., and Braulke, T. (2012). Mannose 6 Dephosphorylation of Lysosomal Proteins Mediated by Acid Phosphatases Acp2 and Acp5. *Mol Cell Biol* 32, 774–782. .

Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J.E., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12, 342–347. .

Marcó, S., Pujol, A., Roca, C., Motas, S., Ribera, A., Garcia, M., Molas, M., Villacampa, P., Melia, C.S., Sánchez, V., et al. (2016). Progressive neurologic and somatic disease in a novel model of human Mucopolysaccharidosis type IIIC. *Dis Model Mech*.

Marcó, S., Haurigot, V., Jaén, M.L., Ribera, A., Sánchez, V., Molas, M., Garcia, M., León, X., Roca, C., Sánchez, X., et al. (2021). Seven-year follow-up of durability and safety of AAV CNS gene therapy for a lysosomal storage disorder in a large animal. *Mol Ther Methods Clin Dev* 23, 370–389. .

Mark, B.L., Mahuran, D.J., Cherney, M.M., Zhao, D., Knapp, S., and James, M.N.G. (2003). Crystal Structure of Human β -Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay-Sachs Disease. *J Mol Biol* 327, 1093–1109. .

Martin, D.R., Krum, B.K., Varadarajan, G.S., Hathcock, T.L., Smith, B.F., and Baker, H.J. (2004). An inversion of 25 base pairs causes feline GM2 gangliosidosis variant. *Exp Neurol* 187, 30–37. .

Martino, S., Marconi, P., Tancini, B., Dolcetta, D., de Angelis, M.G.C., Montanucci, P., Bregola, G., Sandhoff, K., Bordignon, C., Emiliani, C., et al. (2005). A direct gene transfer strategy via brain internal capsule reverses the biochemical defect in Tay–Sachs disease. *Hum Mol Genet* 14, 2113–2123. .

Masingue, M., Dufour, L., Lenglet, T., Saleille, L., Goizet, C., Ayrignac, X., Ory-Magne, F., Barth, M., Lamari, F., Mandia, D., et al. (2020). Natural History of Adult Patients with GM2 Gangliosidosis. *Ann Neurol* 87, 609–617. .

Matsuoka, K., Tamura, T., Tsuji, D., Dohzono, Y., Kitakaze, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., and Itoh, K. (2011). Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human β -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol Ther* 19, 1017–1024. .

McCarty, D.M., Young, S.M., and Samulski, R.J. (2004). Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annu Rev Genet* 38, 819–845. .

McCurdy, V.J., Rockwell, H.E., Arthur, J.R., Bradbury, A.M., Johnson, A.K., Randle, A.N., Brunson, B.L., Hwang, M., Gray-Edwards, H.L., Morrison, N.E., et al. (2015). Widespread correction of central nervous system disease after intracranial gene therapy in a feline model of Sandhoff disease. *Gene Ther* 22, 181–189. .

McCurdy, V.J., Johnson, A.K., Gray-Edwards, H.L., Randle, A.N., Bradbury, A.M., Morrison, N.E., Hwang, M., Baker, H.J., Cox, N.R., Sena-Esteves, M., et al. (2021).

Therapeutic benefit after intracranial gene therapy delivered during the symptomatic stage in a feline model of Sandhoff disease. *Gene Ther* 28, 142–154. .

McDowell, G.A., Mules, E.H., Fabacher, P., Shapira, E., and Blitzer, M.G. (1992). The presence of two different infantile Tay-Sachs disease mutations in a Cajun population. *Am J Hum Genet* 51, 1071. .

McInnes, B., Potier, M., Wakamatsu, N., Melancon, S.B., Klavins, M.H., Tsuji, S., and Mahuran, D.J. (1992a). An unusual splicing mutation in the HEXB gene is associated with dramatically different phenotypes in patients from different racial backgrounds. *J Clin Invest* 90, 306–314. .

McInnes, B., Brown, C.A., and Mahuran, D.J. (1992b). Two small deletion mutations of the HEXB gene are present in DNA from a patient with infantile Sandhoff disease. *Biochim Biophys Acta* 1138, 315–317. .

Meyer, K., Ferraiuolo, L., Schmelzer, L., Braun, L., McGovern, V., Likhite, S., Michels, O., Govoni, A., Fitzgerald, J., Morales, P., et al. (2015). Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose–response Study in Mice and Nonhuman Primates. *Molecular Therapy* 23, 477–487. .

Middeldorp, J., and Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421–443. .

Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12, 341–355. .

Mingozzi, F., Meulenberg, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., et al. (2009). AAV-1–mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077–2086. .

Mitsuo, K., Nakano, T., Kobayashi, T., Goto, I., Taniike, M., and Suzuki, K. (1990). Juvenile Sandhoff disease: a Japanese patient carrying a mutation identical to that found earlier in a Canadian patient. *J Neurol Sci* 98, 277–286. .

Mittal, P., Gupta, R., Garg, P., Mittal, A., Kaur, H., and Gupta, S. (2016). CT and MRI findings in a case of infantile form of GM2 gangliosidosis: Tay-Sachs disease. *Neurol India* 64, 1372. .

Motas, S., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Ribera, A., Roca, C., Sánchez, X., Sánchez, V., Molas, M., Bertolin, J., et al. (2016). CNS-directed gene therapy for the

treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight* 1. .

Mules, E.H., Hayflick, S., Dowling, C.E., Kelly, T.E., Akerman, B.R., Gravel, R.A., and Thomas, G.H. (1992a). Molecular basis of hexosaminidase A deficiency and pseudodeficiency in the Berks County Pennsylvania Dutch. *Hum Mutat* 1, 298–302. .

Mules, E.H., Hayflick, S., Miller, C.S., Reynolds, L.W., and Thomas, G.H. (1992b). Six novel deleterious and three neutral mutations in the gene encoding the alpha-subunit of hexosaminidase A in non-Jewish individuals. *Am J Hum Genet* 50, 834. .

Myerowitz, R., and Costigan, F.C. (1988). The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *Journal of Biological Chemistry* 263, 18587–18589. .

Myerowitz, R., and Hogikyan, N.D. (1986). Different mutations in Ashkenazi Jewish and non-Jewish French Canadians with Tay-Sachs disease. *Science* 232, 1646–1648. .

Myerowitz, R., and Proia, R.L. (1984). cDNA clone for the alpha-chain of human beta-hexosaminidase: deficiency of alpha-chain mRNA in Ashkenazi Tay-Sachs fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5394. .

Myerowitz, R., and Hogikyan, N.D. (1987). A deletion involving Alu sequences in the beta-hexosaminidase alpha-chain gene of French Canadians with Tay-Sachs disease. *J Biol Chem* 262, 15396–15399. .

Nagree, M.S., Scalia, S., McKillop, W.M., and Medin, J.A. (2019). An update on gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther* 19, 655–670. .

Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T.A., Grompe, M., and Kay, M.A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34, 297–302. .

Nakano, T., and Suzuki, K. (1989). Genetic cause of a Juvenile Form of Sandhoff Disease: Abnormal Splicing of β -hexosaminidase β Chain Gene Transcript Due to a Point Mutation within Intron 12. *Journal of Biological Chemistry* 264, 5155–5158. .

Nakano, T., Muscillo, M., Ohno, K., Hoffman, A.J., and Suzuki, K. (1988). A point mutation in the coding sequence of the beta-hexosaminidase alpha gene results in defective processing of the enzyme protein in an unusual GM2-gangliosidosis variant. *J Neurochem* 51, 984–987. .

- Nakano, T., Nanba, E., Tanaka, A., Ohno, K., Suzuki, Y., and Suzuki, K. (1990). A new point mutation within exon 5 of beta-hexosaminidase alpha gene in a Japanese infant with Tay-Sachs disease. *Ann Neurol* 27, 465–473. .
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351–360. .
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., and Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317–334. .
- Navon, R., and Proia, R.L. (1989). The mutations in Ashkenazi Jews with adult GM2 gangliosidosis, the adult form of Tay-Sachs disease. *Science* 243, 1471–1474. .
- Navon, R., and Proia, R.L. (1991). Tay-Sachs disease in Moroccan Jews: deletion of a phenylalanine in the alpha-subunit of beta-hexosaminidase. *Am J Hum Genet* 48, 412. .
- Navon, R., Kolodny, E.H., Mitsumoto, H., Thomas, G.H., and Proia, R.L. (1990). Ashkenazi-Jewish and non-Jewish adult GM2 gangliosidosis patients share a common genetic defect. *Am J Hum Genet* 46, 817. .
- Navon, R., Khosravi, R., Korczyn, T., Masson, M., Sonnino, S., Fardeau, M., Eymard, B., Lefevre, M., Turpin, J.C., Rondot, P., et al. (1995). A new mutation in the HEXA gene associated with a spinal muscular atrophy phenotype. *Neurology* 45, 539–543. .
- Neote, K., McInnes, B., Mahuran, D.J., and Gravel, R.A. (1990). Structure and distribution of an Alu-type deletion mutation in Sandhoff disease. *J Clin Invest* 86, 1524–1531. .
- Nestrasil, I., Ahmed, A., Utz, J.M., Rudser, K., Whitley, C.B., and Jarnes-Utz, J.R. (2018). Distinct progression patterns of brain disease in infantile and juvenile gangliosidoses: Volumetric quantitative MRI study. *Mol Genet Metab* 123, 97–104. .
- Neuwelt, E.A., Johnson, W.G., Blank, N.K., Pagel, M.A., Maslen-McClure, C., McClure, M.J., and Wu, P.M. (1985). Characterization of a new model of GM2-gangliosidosis (Sandhoff's disease) in Korat cats. *J Clin Invest* 76, 482–490. .
- Niemir, N., Rouvière, L., Besse, A., Vanier, M.T., Dmytrus, J., Marais, T., Astord, S., Puech, J.-P., Panasyuk, G., Cooper, J.D., et al. (2018). Intravenous administration of scAAV9-Hexb normalizes lifespan and prevents pathology in Sandhoff disease mice. *Hum Mol Genet* 27, 954–968. .
- O'Dowd, B.F., Klavins, M.H., Willard, H.F., Gravel, R., Lowden, J.A., and Mahuran, D.J. (1986). Molecular heterogeneity in the infantile and juvenile forms of Sandhoff disease (O-variant GM2 gangliosidosis). *Journal of Biological Chemistry* 261, 12680–12685. .

- O'dowd, B.F., Gravel, R.A., Mahuran, D., and Mahuran, D. (1988). Oligosaccharide structure and amino acid sequence of the major glycopeptides of mature human beta-hexosaminidase. *Biochemistry* 27, 5216–5226. .
- Ogawa, Y., Sano, T., Irida, M., Kodama, T., Saito, T., Furusawa, E., Kaizu, K., Yanagi, Y., Tsukimura, T., Togawa, T., et al. (2017). FcRγ-dependent immune activation initiates astrogliosis during the asymptomatic phase of Sandhoff disease model mice. *Sci Rep* 7, 40518. .
- Ohno, K., and Suzuki, K. (1988a). Mutation in GM2-gangliosidosis B1 variant. *J Neurochem* 50, 316–318. .
- Ohno, K., and Suzuki, K. (1988b). Multiple abnormal beta-hexosaminidase alpha chain mRNAs in a compound-heterozygous Ashkenazi Jewish patient with Tay-Sachs disease. *Journal of Biological Chemistry* 263, 18563–18567. .
- Okada, S., and O'Brien, J.S. (1969). Tay-Sachs Disease: Generalized Absence of a Beta-D-N-Acetylhexosaminidase Component. *Science* (1979) 165, 698–700. .
- Oonk, J.G.W., van der Helm, H.J., and Martin, J.J. (1979). Spinocerebellar degeneration: hexosaminidase A and B deficiency in two adult sisters. *Neurology* 29, 380–384. .
- Ornaghi, F., Sala, D., Tedeschi, F., Maffia, M.C., Bazzucchi, M., Morena, F., Valsecchi, M., Aureli, M., Martino, S., and Gritti, A. (2020). Novel bicistronic lentiviral vectors correct β-Hexosaminidase deficiency in neural and hematopoietic stem cells and progeny: implications for in vivo and ex vivo gene therapy of GM2 gangliosidosis. *Neurobiol Dis* 134. .
- Osher, E., Fattal-Valevski, A., Sagie, L., Urshanski, N., Sagiv, N., Peleg, L., Lerman-Sagie, T., Zimran, A., Elstein, D., Navon, R., et al. (2015). Effect of cyclic, low dose pyrimethamine treatment in patients with Late Onset Tay Sachs: an open label, extended pilot study. *Orphanet J Rare Dis* 10. .
- Osmon, K.J., Vyas, M., Woodley, E., Thompson, P., and Walia, J.S. (2018). Battery of Behavioral Tests Assessing General Locomotion, Muscular Strength, and Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments*.
- Osmon, K.J.L., Woodley, E., Thompson, P., Ong, K., Karumuthil-Melethil, S., Keimel, J.G., Mark, B.L., Mahuran, D., Gray, S.J., and Walia, J.S. (2016). Systemic Gene Transfer of a Hexosaminidase Variant Using an scAAV9.47 Vector Corrects GM2 Gangliosidosis in Sandhoff Mice. *Hum Gene Ther* 27, 497–508. .

Ou, L., Przybilla, M.J., and Whitley, C.B. (2019). Metabolomics profiling reveals profound metabolic impairments in mice and patients with Sandhoff disease. *Mol Genet Metab* 126, 151. .

Ou, L., Przybilla, M.J., Tăbăran, A.F., Overn, P., O'Sullivan, M.G., Jiang, X., Sidhu, R., Kell, P.J., Ory, D.S., and Whitley, C.B. (2020). A novel gene editing system to treat both Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Gene Ther* 27, 226. .

Özkara, H.A., Akerman, B.R., Ciliv, G., Topçu, M., Renda, Y., and Gravel, R.A. (1995). Donor splice site mutation in intron 5 of the HEXA gene in a Turkish infant with Tay-Sachs disease. *Hum Mutat* 5, 186–187. .

Ozlu, C., Bailey, R.M., Sinnett, S., and Goodspeed, K.D. (2021). Gene Transfer Therapy for Neurodevelopmental Disorders. *Dev Neurosci* 43, 230–240. .

Pampiglione, G., Privett, G., and Harden, A. (2008). Tay-Sachs Disease: Neurophysiological Studies in 20 Children. *Dev Med Child Neurol* 16, 201–208. .

Parenti, G., Andria, G., and Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: From pathophysiology to therapy. *Annu Rev Med* 66, 471–486. .

Parenti, G., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2021). The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Mol Med* 13, e12836. .

Parker, H., and Bigger, B.W. (2019). The role of innate immunity in mucopolysaccharide diseases. *J Neurochem* 148, 639–651. .

Paw, B.H., and Neufeld, E.F. (1988). Normal transcription of the beta-hexosaminidase alpha-chain gene in the Ashkenazi Tay-Sachs mutation. *Journal of Biological Chemistry* 263, 3012–3015. .

Paw, B.H., Kaback, M.M., and Neufeld, E.F. (1989). Molecular basis of adult-onset and chronic GM2 gangliosidoses in patients of Ashkenazi Jewish origin: substitution of serine for glycine at position 269 of the alpha-subunit of beta-hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2413. .

Paw, B.H., Tieu, P.T., Kaback, M.M., Limt, J., and Neufeld, E.F. (1990a). Frequency of Three Hex A Mutant Alleles among Jewish and Non-Jewish Carriers Identified in a Tay-Sachs Screening Program. *Am. J. Hum. Genet* 47, 698–705. .

Paw, B.H., Moskowitz, S.M., Uhrhammer, N., Wright, N., Kabackl, M.M., and Neufeldq, E.F. (1990b). Juvenile GM2 gangliosidosis caused by substitution of histidine for arginine

at position 499 or 504 of the alpha-subunit of beta-hexosaminidase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 9452–9457. .

Paw, B.H., Wood, L.C., and Neufeld, E.F. (1991). A third mutation at the CpG dinucleotide of codon 504 and a silent mutation at codon 506 of the HEX A gene. *Am J Hum Genet* 48, 1139. .

Peleg, L., Meltzer, F., Karpati, M., and Goldman, B. (1995). GM2 gangliosidosis B1 variant: biochemical and molecular characterization of hexosaminidase A. *Biochem Mol Med* 54, 126–132. .

Phaneuf, D., Wakamatsu, N., Huang, J.-Q., Borowski, A., Peterson, A.C., Fortunato, S.R., Ritter, G., Igdoura, S.A., Morales, C.R., Benoit, G., et al. (1996). Dramatically Different Phenotypes in Mouse Models of Human Tay-Sachs and Sandhoff Diseases. *Hum Mol Genet* 5, 1–14. .

Picache, J.A., Zheng, W., and Chen, C.Z. (2022). Therapeutic Strategies For Tay-Sachs Disease. *Front Pharmacol* 13. .

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

Platt, F.M., and Jeyakumar, M. (2008). Substrate reduction therapy. *Acta Paediatr* 97, 88–93. .

Platt, F.M., d'Azzo, A., Davidson, B.L., Neufeld, E.F., and Tiffit, C.J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers* 4. .

Poenaru, L., and Akli, S. (1994). Molecular epidemiology of Tay-Sachs disease in Europe. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 48, 341–346. .

Porter, B.F., Lewis, B.C., Edwards, J.F., Alroy, J., Zeng, B.J., Torres, P.A., Bretzlaff, K.N., and Kolodny, E.H. (2011). Pathology of GM2 gangliosidosis in Jacob sheep. *Vet Pathol* 48, 807–813. .

Prasad, V.K., Mendizabal, A., Parikh, S.H., Szabolcs, P., Driscoll, T.A., Page, K., Lakshminarayanan, S., Allison, J., Wood, S., Semmel, D., et al. (2008). Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. *Blood* 112, 2979–2989. .

Proia, R.L. (1988). Gene encoding the human β -hexosaminidase β chain: Extensive homology of intron placement in the α - and β -chain genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1883–1887. .

Proia, R.L., and Neufeld, E.F. (1982). Synthesis of beta-hexosaminidase in cell-free translation and in intact fibroblasts: an insoluble precursor alpha chain in a rare form of Tay-Sachs disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6360–6364. .

Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76, 791–801. .

Rastall, D.P.W., and Amalfitano, A. (2015). Recent advances in gene therapy for lysosomal storage disorders. *Appl Clin Genet* 8, 157–169. .

Redonnet-Vernhet, I., Mahuran, D.J., Salvayre, R., Dubas, F., and Levade, T. (1996). Significance of two point mutations present in each HEXB allele of patients with adult GM2 gangliosidosis (Sandhoff disease) homozygosity for the Ile207-->Val substitution is not associated with a clinical or biochemical phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1317, 127–133. .

Regier, D.S., Proia, R.L., D'Azzo, A., and Tiffit, C.J. (2016). The GM1 and GM2 Gangliosidoses: Natural History and Progress toward Therapy. *Pediatr Endocrinol Rev* 13 Suppl 1, 663–673. .

Ribeiro, M.G., Pinto, R., Sa Miranda, M.C., and Suzuki, K. (1995). Tay-Sachs disease: Intron 7 splice junction mutation in two Portuguese patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1270, 44–51. .

Ribeiro, M.G., Sonin, T., Pinto, R.A., Fontes, A., Ribeiro, H., Pinto, E., Palmeira, M.M., and Sá Miranda, M.C. (1996). Clinical, enzymatic, and molecular characterisation of a Portuguese family with a chronic form of GM2-gangliosidosis B1 variant. *J Med Genet* 33, 341–343. .

Ribera, A., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Motas, S., Villacampa, P., Maggioni, L., León, X., Molas, M., Sánchez, V., et al. (2015). Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy. *Hum Mol Genet* 24, 2078–2095. .

Richard, M.M., Erenberg, G., and Triggsraine, B.L. (1995). An A-to-G mutation at the +3 position of intron 8 of the HEXA gene is associated with exon 8 skipping and Tay-Sachs disease. *Biochem Mol Med* 55, 74–76. .

Riederer, M.A., Soldati, T., Shapiro, A.D., Lin, J., and Pfeffer, S.R. (1994). Lysosome Biogenesis Requires Rab9 Function and Receptor Recycling from Endosomes to the trans-Golo Network. *J Cell Biol* 125, 573–582. .

Roca, C., Motas, S., Marco, S., Ribera, A., Sanchez, V., Sanchez, X., Bertolin, J., Leon, X., Perez, J., Garcia, M., et al. (2017). Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID. *Hum Mol Genet* 26, 1535–1551. .

Rockwell, H.E., McCurdy, V.J., Eaton, S.C., Wilson, D.U., Johnson, A.K., Randle, A.N., Bradbury, A.M., Gray-Edwards, H.L., Baker, H.J., Hudson, J.A., et al. (2015). AAV-mediated gene delivery in a feline model of Sandhoff disease corrects lysosomal storage in the central nervous system. *ASN Neuro* 7. .

Ronzitti, G., Gross, D.-A., and Mingozzi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol* 11. .

Rosario, M., Santos, D., Tanaka, A., Clara Sa Miranda, ? M, Ribeiro, M.G., Maia, M., and Suzukil, K. (1991). GM2-Gangliosidosis B I Variant: Analysis of 1-Hexosaminidase a Gene Mutations in I I Patients from a Defined Region in Portugal. *Am. J. Hum. Genet* 49, 886–890. .

van Rosmalen, M., Krom, M., and Merkx, M. (2017). Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers To Allow Rational Design of Multidomain Proteins. *Biochemistry* 56, 6565–6574. .

Ruzo, A., Garcia, M., Ribera, A., Villacampa, P., Haurigot, V., Marcó, S., Ayuso, E., Anguela, X.M., Roca, C., Agudo, J., et al. (2012). Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther* 20, 254–266. .

Sabatino, D.E., Bushman, F.D., Chandler, R.J., Crystal, R.G., Davidson, B.L., Dolmetsch, R., Eggan, K.C., Gao, G., Gil-Farina, I., Kay, M.A., et al. (2022). Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Molecular Therapy* 30, 2646–2663. .

Sachs, B. (1896). A Family Form of Idiocy: Generally Fatal, and Associated with Early Blindness (amaurotic Family Idiocy). *J. Neru. Ment. Dis* 21, 475. .

- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 623–635. .
- Saher, G., and Simons, M. (2010). Cholesterol and Myelin Biogenesis. In *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*, pp. 489–508.
- Saher, G., and Stumpf, S.K. (2015). Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 1083–1094. .
- Saher, G., Quintes, S., and Nave, K.-A. (2011). Cholesterol: A Novel Regulatory Role in Myelin Formation. *The Neuroscientist* 17, 79–93. .
- Samulski, R.J., and Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol* 1, 427–451. .
- Sandhoff, K. (1969). Variation of β -N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay-Sachs disease. *FEBS Lett* 4, 351–354. .
- Sandhoff, K., and Harzer, K. (2013). Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *Journal of Neuroscience* 33, 10195–10208. .
- Sandhoff, R., Schulze, H., and Sandhoff, K. (2018). Ganglioside Metabolism in Health and Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier B.V.), pp. 1–62.
- Sands, M.S. (2012). AAV-Mediated Liver-Directed Gene Therapy. In *Adeno-Associated Virus*, pp. 141–157.
- Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., et al. (1995). Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet* 11, 170–176. .
- Sango, K., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Mack, M.L., Tiff, C.J., Skop, E., Starr, C.M., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K., et al. (1996). Mice lacking both subunits of lysosomal β -hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet* 14, 348–352. .
- Sardiello, M., Palmieri, M., Ronza, A. di, Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473–477. .

- Schnaar, R.L. (2019). The Biology of Gangliosides. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (Academic Press Inc.), pp. 113–148.
- Schröder, M., Klima, H., Nakano, T., Kwon, H., Quintern, L.E., Gärtner, S., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1989). Isolation of a cDNA encoding the human GM2 activator protein. *FEBS Lett* *251*, 197–200. .
- Schuette, C.G., Doering, T., Kolter, T., and Sandhoff, K. (1999). The Glycosphingolipidoses from Disease to Basic Principles of Metabolism. *Biol Chem* *380*. .
- Seranova, E., Connolly, K.J., Zatyka, M., Rosenstock, T.R., Barrett, T., Tuxworth, R.I., and Sarkar, S. (2017). Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases. *Essays Biochem* *61*, 733–749. .
- Settembre, C., Fraldi, A., Jahreiss, L., Spampinato, C., Venturi, C., Medina, D., de Pablo, R., Tacchetti, C., Rubinsztein, D.C., and Ballabio, A. (2008). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* *17*, 119–129. .
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 283–296. .
- Seyrantepe, V., Demir, S.A., Timur, Z.K., von Gerichten, J., Marsching, C., Erdemli, E., Oztas, E., Takahashi, K., Yamaguchi, K., Ates, N., et al. (2018). Murine Sialidase Neu3 facilitates GM2 degradation and bypass in mouse model of Tay-Sachs disease. *Exp Neurol* *299*, 26–41. .
- Shaimardanova, A., Chulpanova, D., Solovyeva, V., Aimaletdinov, A., and Rizvanov, A. (2022). Functionality of a bicistronic construction containing HEXA and HEXB genes encoding β -hexosaminidase A for cell-mediated therapy of GM2 gangliosidoses. *Neural Regen Res* *17*, 122. .
- Shaimardanova, A.A., Kitaeva, K. v., Abdrakhmanova, I.I., Chernov, V.M., Rutland, C.S., Rizvanov, A.A., Chulpanova, D.S., and Solovyeva, V. v. (2019). Production and Application of Multicistronic Constructs for Various Human Disease Therapies. *Pharmaceutics* *11*, 580. .
- Shapiro, B.E., and Natowicz, M.R. (2009). Late-onset Tay-Sachs disease presenting as a childhood stutter. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *80*, 94–95. .

- Sheth, J., Datar, C., Mistri, M., Bhavsar, R., Sheth, F., and Shah, K. (2016). GM2 gangliosidosis AB variant: novel mutation from India - a case report with a review. *BMC Pediatr* 16. .
- Shimada, Y., Li, Y.T., and Li, S.C. (2003). Effect of GM2 activator protein on the enzymatic hydrolysis of phospholipids and sphingomyelin. *J Lipid Res* 44, 342–348. .
- Shore, S., Tomczak, J., Grebner, E.E., and Myerowitz, R. (1992). An unusual genotype in an Ashkenazi Jewish patient with Tay-Sachs disease. *Hum Mutat* 1, 486–490. .
- Simonaro, C.M. (2019). Lysosomes, Lysosomal Storage Diseases, and Inflammation. *J Inborn Errors Metab Screen* 4. .
- Simons, M., Krämer, E.-M., Thiele, C., Stoffel, W., and Trotter, J. (2000). Assembly of Myelin by Association of Proteolipid Protein with Cholesterol- and Galactosylceramide-Rich Membrane Domains. *Journal of Cell Biology* 151, 143–154. .
- Slome, D. (1933). The genetic basis of amaurotic family idiocy. *J Genet* 27, 363–376. .
- Solovyeva, V. v., Shaimardanova, A.A., Chulpanova, D.S., Kitaeva, K. v., Chakrabarti, L., and Rizvanov, A.A. (2018). New approaches to Tay-Sachs disease therapy. *Front Physiol* 9. .
- Somaraju, U.R., and Tadepalli, K. (2017). Hematopoietic stem cell transplantation for Gaucher disease. *Cochrane Database Syst Rev* 10. .
- Somers, G. (2013). Structural Aspects of Fusion Proteins Determining the Level of Commercial Success. In *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 39–56.
- Strohl, W.R. (2015). Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs* 29, 215–239. .
- Sun, A., Chang, I.J., Lam, C., and Berry, G.T. (2021). Lysosomal Storage Disorders. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics*, (Elsevier), pp. 563–682.
- Svennerholm, L. (1962). The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 9, 436–441. .
- Tanaka, A., Ohno, K., and Suzuki, K. (1988). GM2-gangliosidosis B1 variant: A wide geographic and ethnic distribution of the specific β -hexosaminidase α chain mutation originally identified in a puero rican patient. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 1015–1019. .

- Tanaka, A., Ohno, K., Sandhoff, K., Maire, L., Kolodny, E.H., Brown, A., and Suzuki, K. (1990a). GM2-Gangliosidosis BI Variant: Analysis of I-Hexosaminidase a Gene Abnormalities in Seven Patients. *Am. J. Hum. Genet* *46*, 329–339. .
- Tanaka, A., Punnett, H.H., and Suzuki, K. (1990b). A new point mutation in the beta-hexosaminidase alpha subunit gene responsible for infantile Tay-Sachs disease in a non-Jewish Caucasian patient (a Kpn mutant). *Am J Hum Genet* *47*, 568. .
- Tanaka, A., Sakuraba, H., Isshiki, G., and Suzuki, K. (1993). The Major Mutation Among Japanese Patients with Infantile Tay-Sachs Disease: A G-to-T Transversion at the Acceptor Site of Intron 5 of the β -Hexosaminidase α -Gene. *Biochem Biophys Res Commun* *192*, 539–546. .
- Tanaka, A., Sakazaki, H., Murakami, H., Isshiki, G., and Suzuki, K. (1994). Molecular genetics of Tay-Sachs disease in Japan. *J Inherit Metab Dis* *17*, 593–600. .
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In *Autophagosome and Phagosome*, pp. 77–88.
- Taniike, M., Yamanaka, S., Proia, R.L., Langaman, C., Bone-Turrentine, T., and Suzuki, K. (1995). Neuropathology of mice with targeted disruption of Hexa gene, a model of Tay-Sachs disease. *Acta Neuropathol* *89*, 296–304. .
- Tardieu, M., Zérah, M., Husson, B., de Bournonville, S., Deiva, K., Adamsbaum, C., Vincent, F., Hocquemiller, M., Broissand, C., Furlan, V., et al. (2014). Intracerebral Administration of Adeno-Associated Viral Vector Serotype rh.10 Carrying Human *SGSH* and *SUMF1* cDNAs in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIA Disease: Results of a Phase I/II Trial. *Hum Gene Ther* *25*, 506–516. .
- Tardieu, M., Zérah, M., Gougeon, M.-L., Ausseil, J., de Bournonville, S., Husson, B., Zafeiriou, D., Parenti, G., Bourget, P., Poirier, B., et al. (2017). Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *Lancet Neurol* *16*, 712–720. .
- Tay, W. (1969). Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye op an infant. *Arch Neurol* *20*, 104–106. .
- Testa, F., Maguire, A.M., Rossi, S., Pierce, E.A., Melillo, P., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., Sun, J., Acerra, C., et al. (2013). Three-Year Follow-up after Unilateral Subretinal Delivery of Adeno-Associated Virus in Patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2. *Ophthalmology* *120*, 1283–1291. .

Tomczak, J., and Grebner, E.E. (1994). Three novel beta-hexosaminidase A mutations in obligate carriers of Tay-Sachs disease. *Hum Mutat* 4, 71–72. .

Tomczak, J., Boogen, C., and Grebner, E.E. (1993). Distribution of a pseudodeficiency allele among Tay-Sachs carriers. *Am J Hum Genet* 53, 537–539. .

Tong, Y., Jørgensen, T.S., Whitford, C.M., Weber, T., and Lee, S.Y. (2021). A versatile genetic engineering toolkit for *E. coli* based on CRISPR-prime editing. *Nat Commun* 12, 5206. .

Toro, C., Shirvan, L., and Tifft, C. (2020). HEXA Disorders.

Toro, C., Zainab, M., and Tifft, C.J. (2021). The GM2 gangliosidoses: Unlocking the mysteries of pathogenesis and treatment. *Neurosci Lett* 764. .

Torres, P.A., Zeng, B.J., Porter, B.F., Alroy, J., Horak, F., Horak, J., and Kolodny, E.H. (2010). Tay-Sachs disease in Jacob sheep. *Mol Genet Metab* 101, 357–363. .

Triggs-Raine, B., Richard, M., Wasel, N., Prence, E.M., and Natowicz, M.R. (1995). Mutational Analyses of Tay-Sachs Disease: Studies on Tay-Sachs Carriers of French Canadian Background Living in New England. *Am. J. Hum. Genet* 56, 870–879. .

Triggs-Raine, B., Mahuran, D.J., and Gravel, R.A. (2001). Naturally Occurring Mutations in G M2 Gangliosidosis: A Compendium. *Adv Genet* 44, 199–224. .

Triggs-Raine, B.L., Feigenbaum, A.S.J., Natowicz, M., Skomorowski, M.-A., Schuster, S.M., Clarke, J.T.R., Mahuran, D.J., Kolodny, E.H., and Gravel, R.A. (1990). Screening for carriers of Tay-Sachs disease among Ashkenazi Jews. A comparison of DNA-based and enzyme-based tests. *N Engl J Med* 323, 6–12. .

Triggs-Raine, B.L., Akerman, B.R., Clarke, J.T.R., and Gravel, R.A. (1991). Sequence of DNA flanking the exons of the HEXA gene, and identification of mutations in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* 49, 1041. .

Triggs-Raine, B.L., Mules, E.H., Kaback, M.M., Lim-Steele, J.S.T., Dowling, C.E., Akerman, B.R., Natowicz, M.R., Grebner, I.E.E., Navon, R., Welch, J.P., et al. (1992). A Pseudodeficiency Allele Common in Non-Jewish Tay-Sachs Carriers: Implications for Carrier Screening. *Am. J. Hum. Genet* 51, 793–801. .

Trop, I., Kaplan, F., Brown, C., Mahuran, D., and Hechtman, P. (1992). A glycine250--> aspartate substitution in the alpha-subunit of hexosaminidase A causes juvenile-onset Tay-Sachs disease in a Lebanese-Canadian family. *Hum Mutat* 1, 35–39. .

- Tropak, M.B., Yonekawa, S., Karumuthil-Meilethil, S., Thompson, P., Wakarchuk, W., Gray, S.J., Walia, J.S., Mark, B.L., and Mahuran, D. (2016). Construction of a hybrid β -hexosaminidase subunit capable of forming stable homodimers that hydrolyze GM2 ganglioside in vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3, 15057. .
- Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., and Itoh, K. (2005). Metabolic correction in microglia derived from Sandhoff disease model mice. *J Neurochem* 94, 1631–1638. .
- Tsuji, D., Akeboshi, H., Matsuoka, K., Yasuoka, H., Miyasaki, E., Kasahara, Y., Kawashima, I., Chiba, Y., Jigami, Y., Taki, T., et al. (2011). Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis. *Ann Neurol* 69, 691–701. .
- Utz, J.R.J., Crutcher, T., Schneider, J., Sorgen, P., and Whitley, C.B. (2015). Biomarkers of central nervous system inflammation in infantile and juvenile gangliosidoses. *Mol Genet Metab* 114, 274–280. .
- Vellodi, A. (2005). Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128, 413–431. .
- Virgolini, M.J., Feliziani, C., Cambiasso, M.J., Lopez, P.H., and Bollo, M. (2019). Neurite atrophy and apoptosis mediated by PERK signaling after accumulation of GM2-ganglioside. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866, 225–239. .
- Visigalli, I., Delai, S., Politi, L.S., di Domenico, C., Cerri, F., Mrak, E., D’Isa, R., Ungaro, D., Stok, M., Sanvito, F., et al. (2010). Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood* 116, 5130–5139. .
- Wada, R., Tiffit, C.J., and Proia, R.L. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10954–10959. .
- Wada, R., Tiffit, C.J., and Proia, R.L. (2001). Microglial activation and inflammatory reaction preceding neurodegeneration in Sandhoff disease. *Int Congr Ser* 1223, 23–27. .
- Wakamatsu, N., Kobayashi, H., Miyatake, T., and Tsuji, S. (1992). A novel exon mutation in the human beta-hexosaminidase beta subunit gene affects 3' splice site selection. *Journal of Biological Chemistry* 267, 2406–2413. .
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., and Terwilliger, T.C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17, 691–695. .

Walia, J.S., Altaieb, N., Bello, A., Kruck, C., LaFave, M.C., Varshney, G.K., Burgess, S.M., Chowdhury, B., Hurlbut, D., Hemming, R., et al. (2015). Long-Term Correction of Sandhoff Disease Following Intravenous Delivery of rAAV9 to Mouse Neonates. *Molecular Therapy* 23, 414–422. .

Walker, D.G., and Lue, L.-F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther* 7, 56. .

Walkley, S.U. (2003). Neurobiology and cellular pathogenesis of glycolipid storage diseases. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, (Royal Society), pp. 893–904. .

Walkley, S.U., and Vanier, M.T. (2009). Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 726–736. .

Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 18, 358–378. .

Wang, L., Calcedo, R., Nichols, T.C., Bellinger, D.A., Dillow, A., Verma, I.M., and Wilson, J.M. (2005). Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 105, 3079–3086. .

Werner, H.B., Krämer-Albers, E.M., Strenzke, N., Saher, G., Tenzer, S., Ohno-Iwashita, Y., de Monasterio-Schrader, P., Möbius, W., Moser, T., Griffiths, I.R., et al. (2013). A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia* 61, 567–586. .

Wilcox, W.R. (2004). Lysosomal storage disorders: The need for better pediatric recognition and comprehensive care. *Journal of Pediatrics* 144, S3–S14. .

Winchester, B., Vellodi, A., and Young, E. (2000). The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem Soc Trans* 28, 150–154. .

Woodley, E., Osmon, K.J.L., Thompson, P., Richmond, C., Chen, Z., Gray, S.J., and Walia, J.S. (2018). Efficacy of a Bicistronic Vector for Correction of Sandhoff Disease in a Mouse Model. *Mol Ther Methods Clin Dev* 12, 47–57. .

Yamaguchi, A., Katsuyama, K., Nagahama, K., Takai, T., Aoki, I., and Yamanaka, S. (2004). Possible role of autoantibodies in the pathophysiology of GM2 gangliosidosis. *Journal of Clinical Investigation* 113, 200. .

- Yamanaka, S., Johnson, M.D., Grinberg, A., Westphal, H., Crawley, J.N., Taniike, M., Suzuki, K., and Proia, R.L. (1994). Targeted disruption of the Hexa gene results in mice with biochemical and pathologic features of Tay-Sachs disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9975–9979. .
- Yamato, O., Satoh, H., Shoda, T., Yamasaki, M., Maede, Y., Matsunaga, S., Takata, K., Uetsuka, K., Baba, Y., Yasoshima, A., et al. (2004). GM2-gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in a family of Japanese domestic cats. *Veterinary Record* *155*, 739–744. .
- Yang, F., Guan, Y., Feng, X., Rolfs, A., Schlüter, H., and Luo, J. (2019). Proteomics of the corpus callosum to identify novel factors involved in hypomyelinated Niemann-Pick Type C disease mice. *Mol Brain* *12*, 1–11. .
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J. Oleo Sci* *60*, 537–544. .
- Zampieri, S., Cattarossi, S., Ramirez, A.M., Rosano, C., Lourenco, C.M., Passon, N., Moroni, I., Uziel, G., Pettinari, A., Stanzial, F., et al. (2012). Sequence and copy number analyses of HEXB gene in patients affected by Sandhoff disease: functional characterization of 9 novel sequence variants (PLoS One).
- Zhang, J., Yun, J., Shang, Z., Zhang, X., and Pan, B. (2009). Design and optimization of a linker for fusion protein construction. *Progress in Natural Science* *19*, 1197–1200. .
- Zhang, J., Chen, H., Kornreich, R., and Yu, C. (2019). Prenatal Diagnosis of Tay-Sachs Disease. *Methods Mol Biol* *1885*, 233–250. .
- Zhang, Z., Yue, P., Lu, T., Wang, Y., Wei, Y., and Wei, X. (2021). Role of lysosomes in physiological activities, diseases, and therapy. *J Hematol Oncol* *14*, 79. .
- Zhang, Z.X., Wakamatsu, N., Mules, E.H., Thomas, G.H., and Gravel, R.A. (1994). Impact of premature stop codons on mRNA levels in infantile Sandhoff disease. *Hum Mol Genet* *3*, 139–145. .
- Zhang, Z.X., Wakamatsu, N., Akerman, B.R., Mules, E.H., Thomas, G.H., and Gravel, R.A. (1995). A second, large deletion in the HEXB gene in a patient with infantile Sandhoff disease. *Hum Mol Genet* *4*, 777–780. .
- Zokaeem, G., Bayleran, J., Kaplan, P., Hechtman, P., and Neufeld, E.F. (1987). A shortened beta-hexosaminidase alpha-chain in an Italian patient with infantile Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* *40*, 537. .

Zwierz, K., Zalewska, A., and Zoch-Zwierz, W. (1999). Isoenzymes of N-acetyl-beta-hexosaminidase. *Acta Biochim Pol* 46, 739–751. .