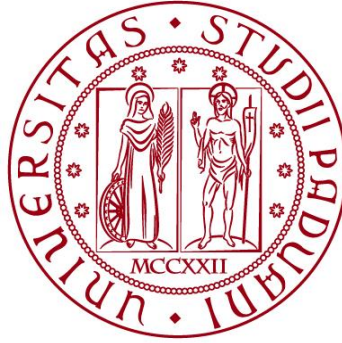


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**APPROCCIO TERAPEUTICO BASATO SU
SOSTITUZIONE GENICA MEDIANTE L'UTILIZZO DI
VIRUS ADENO-ASSOCIATI PER LA SINDROME DI
LEIGH**

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

Laureanda: Francesca Ciciarella

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

Abstract	1
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	2
1.1 Le malattie mitocondriali.....	2
1.2 La sindrome di Leigh.....	2
1.3 Mutazioni in SURF1 causano la sindrome di Leigh	3
CAPITOLO 2: RISULTATI	5
2.1 Vettori virali adeno-associati	5
2.2 Progettazione ed espressione del vettore per il trasferimento genico.....	6
2.3 La somministrazione del vettore AAV9/hSURF1 migliora l'attività del complesso IV e riduce i livelli di lattato.....	7
2.4 Misura dei livelli di espressione di SURF1 e della proteina MT-CO1.....	11
CAPITOLO 3: METODI SPERIMENTALI	12
3.1 Western Blot.....	12
3.2 Real-time PCR.....	12
3.3 Analisi dell'attività del complesso IV	13
3.4 Misura dei livelli di lattato.....	13
3.5 RNAscope	14
3.6 Immunohistochimica (IHC).....	15
CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	15
BIBLIOGRAFIA	18

Abstract

La malattia di Leigh, o encefalomielopatia necrotizzante subacuta, è una malattia mitocondriale neurodegenerativa ad insorgenza precoce. Le malattie mitocondriali sono un insieme di patologie legate al malfunzionamento della catena respiratoria e possono insorgere a qualsiasi età presentando effetti multisistemici.

Ad oggi non esistono trattamenti terapeutici efficaci per le malattie mitocondriali motivo per cui le cure si limitano a trattare le complicazioni causate dalla malattia. Una delle cause più comuni della sindrome di Leigh deriva da mutazioni nel gene nucleare SURF1.

Gli autori dell'articolo preso in analisi hanno testato un nuovo approccio terapeutico basato sull'impiego di vettori virali ricombinanti adeno-associati (AAV) per il trasferimento e la sostituzione del gene SURF1. Gli studi preclinici sono stati condotti su topi knockout per SURF1.

I dati ottenuti indicano che una singola somministrazione intratecale del vettore AAV9/hSURF1 è sufficiente per ripristinare parzialmente e significativamente l'attività del complesso IV in tutti i tessuti testati. Da ciò è emerso che l'attività del complesso IV, esaminata tramite il livello di espressione della proteina MT-CO1, è aumentata dopo il trattamento. In un gruppo separato di topi è stato osservato che 9 mesi dopo il trattamento con AAV9/hSURF1, anche i livelli di lattato nel sangue si erano ridotti.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Le malattie mitocondriali

Le malattie mitocondriali sono un gruppo eterogeneo di patologie legate al metabolismo energetico, in particolare alla disfunzione della catena respiratoria. Trattandosi di patologie molto eterogenee, presentano una notevole variabilità sia nei sintomi che nell'età di insorgenza della malattia. Inoltre, gli effetti delle mutazioni che portano a queste patologie tendono ad essere multisistemici, cioè, interessano diversi tessuti e organi, in particolare quelli che sono fortemente dipendenti dal metabolismo energetico.

Queste patologie progrediscono molto velocemente e, hanno un elevato tasso di mortalità e ancora oggi, purtroppo, non esistono trattamenti terapeutici mirati a prevenire la loro insorgenza [1].

1.2 La sindrome di Leigh

La sindrome di Leigh, o encefalomiopatia necrotizzante subacuta, è una malattia mitocondriale recessiva a insorgenza precoce e una delle più frequenti in età pediatrica.

Si tratta di una malattia neurodegenerativa, geneticamente eterogenea di cui, ad oggi, sono state identificate mutazioni in più di 75 geni, codificati sia dal genoma nucleare che dal genoma mitocondriale.

La localizzazione dei geni nel genoma nucleare o in quello mitocondriale, ritenuti responsabili della malattia, determina la modalità di trasmissione della malattia. A tal proposito è opportuno fare una distinzione tra le patologie dovute a mutazioni che avvengono nei geni mitocondriali e quelle che avvengono nei geni nucleari. Le prime verranno trasmesse solo dalla madre affetta a tutti i figli di entrambi i sessi, motivo per cui si parla di ereditarietà matrilineare o uni-parentale. Le seconde, invece, quelle causate da mutazioni dei geni nucleari seguono un'ereditarietà di tipo mendeliano e quindi, possono essere autosomiche recessive o X-linked [2].

I pazienti affetti dalla malattia di Leigh possono presentare sintomi molto diversi fra loro, la cui diversità dipende anche dall'età di insorgenza della malattia. Generalmente la malattia si manifesta intorno ai due anni di età, in seguito a infezioni o malattie precedute da un periodo di sviluppo normale, e i sintomi sono principalmente neurologici, come ritardo nello sviluppo, regressione dello sviluppo, ipotonia, atassia, distonia e anomalie agli occhi e alla vista.

Inoltre, tramite immagini ottenute attraverso risonanza magnetica è stato osservato che i pazienti affetti da LS presentano lesioni specifiche a livello del tronco encefalico e dei gangli basali.

Essendo una malattia clinicamente molto eterogenea, sono state osservate disfunzioni anche a livello cardiaco, epatico, gastrointestinale e renale.

La progressione della malattia è molto rapida, motivo per cui, i pazienti affetti hanno un'aspettativa media di vita di circa tre anni [2].

La varietà nella manifestazione clinica delle malattie mitocondriali rende complessi sia la diagnosi che il trattamento di queste patologie.

In merito alla diagnosi, questa generalmente si basa su analisi biochimiche e istochimiche delle biopsie tissutali e test genetici. Negli ultimi decenni con l'avvento delle nuove tecnologie di sequenziamento, come NGS, il successo diagnostico delle malattie mitocondriali è passato dal 20% al 60% [1]

Per la diagnosi della sindrome di Leigh devono essere rispettati dei criteri ben precisi. In particolare, insieme alla presenza di una neurodegenerazione progressiva, deve esserci un'evidenza clinica di disfunzione del tronco encefalico e dei gangli della base, seguita da un ritardo nello sviluppo intellettuale e motorio. Deve essere evidente, inoltre, un'anomalia nel metabolismo energetico indicato da un grave difetto nella fosforilazione ossidativa, nel complesso della piruvato deidrogenasi o da elevati livelli di lattato nel sangue.

La maggior parte dei geni, responsabili dell'insorgenza della malattia, codificano componenti strutturali della catena respiratoria o proteine necessarie per l'assemblaggio delle varie componenti.

Nei pazienti affetti da sindrome di Leigh sono stati osservati difetti biochimici in ciascuno dei 5 complessi multiproteici che formano la catena respiratoria; in particolare, il difetto nel complesso I risulta essere quello che più frequentemente causa la sindrome di Leigh in quanto circa un terzo di tutti i geni malattia di LS sono associati a difetti del complesso I [2].

1.3 Mutazioni in SURF1 causano la sindrome di Leigh

Una delle cause più comuni della sindrome di Leigh deriva da mutazioni che causano la perdita totale o parziale di funzione nel genoma nucleare che codifica il gene SURF1. Le mutazioni che riguardano SURF1 sono tipicamente autosomiche recessive, in cui il paziente eredita una copia difettiva del gene da ciascun genitore portatore sano.

La proteina SURF1 si localizza nella membrana mitocondriale interna e strutturalmente presenta due eliche transmembrana con un loop di connessione rivolto verso lo spazio intermembrana.

Diversi studi suggeriscono che la proteina SURF1 sia coinvolta nell'assemblaggio della catena respiratoria ed in particolare sembra svolgere un ruolo essenziale nell'assemblaggio e nella stabilizzazione del complesso IV della catena respiratoria. Da ciò si capisce il motivo per cui, nella maggior parte dei casi, i pazienti affetti da sindrome di Leigh correlata al gene SURF1 mostrano una diminuzione dell'attività del complesso IV dell'80%-90%. Inoltre, l'81% dei pazienti affetti mostra anche elevati livelli di lattato nel sangue.

In quanto alle cure, ad oggi esistono solo cure palliative e terapie mirate a prevenire o trattare le complicazioni dovute alla malattia.

Tuttavia, durante gli ultimi due decenni, è stata ampiamente sperimentata la terapia genica basata sui vettori virali la quale, sembra dare buoni risultati nel trattamento

delle malattie genetiche. In particolare, in numerosi studi è stato dimostrato che il vettore virale ricombinante adeno-associato (rAAV) si presta ad essere un vettore sicuro ed efficace per il trasferimento genico a diversi tessuti, mostrando specificità tissutale da parte di diversi sierotipi. Un esempio è il sierotipo 9 dell'AAV (AAV9) che risulta essere la scelta migliore per il trasferimento genico nel sistema nervoso centrale (SNC), grazie alla sua capacità di mediare un'ampia espressione del transgene in tutti i tessuti del SNC.

Gli autori dell'articolo hanno testato un potenziale trattamento terapeutico per i pazienti affetti da sindrome di Leigh correlata al gene SURF1. È stato sviluppato un vettore per il trasferimento genico utilizzando l'AAV9 per trasferire il gene umano SURF1 modificato in modo da ottimizzare l'efficienza della traduzione dei suoi codoni in proteine.

I modelli murini utilizzati presentano una mutazione frameshift nell'esone 7 del gene SURF1 che causa la perdita totale di espressione della proteina.

Questa terapia sperimentale è stata progettata per far esprimere ampiamente il gene hSURF1 nel sistema nervoso centrale in modo da recuperare parzialmente l'attività del complesso IV, oltre a diminuire gli alti livelli di lattato nel sangue.

Inoltre, gli autori hanno condotto degli studi per valutare la sicurezza del trattamento e i dati ottenuti hanno confermato che una singola somministrazione intratecale del vettore AAV9/hSURF1 è sicura ed efficace, ed è sufficiente per attenuare le disfunzioni del complesso IV correlata alla carenza del gene SURF1.

Questo suggerisce che tale terapia ha il potenziale per essere ulteriormente sviluppata e migliorata al fine di trattare i pazienti con sindrome di Leigh correlata al gene SURF1.

CAPITOLO 2: RISULTATI

2.1 Vettori virali adeno-associati

L'approccio terapeutico sviluppato in questo articolo si basa sull'utilizzo dei virus adeno-associati. Si tratta di virus a DNA appartenenti alla famiglia dei parvovirus la cui caratteristica distintiva è la presenza di un genoma a singolo filamento (ssDNA) con sequenze terminali palindromiche ripetute ad ogni estremità. Tali sequenze formano una struttura a forcina, la quale funge sia da origine di replicazione durante la prima infezione sia da primer per la DNA polimerasi cellulare per sintetizzare il filamento complementare.

Grazie alla loro capacità di trasferire il genoma all'interno della cellula ospite senza però provocare l'infezione, i virus adeno-associati sono ampiamente utilizzati nel campo dell'ingegneria genetica. Sono virus che necessitano di un virus helper co-infettante per innescare l'infezione, in quanto non posseggono nel loro genoma gli elementi necessari per sintetizzare le particelle virali [3].

Il vettore per il trasferimento genico è stato costruito utilizzando il vettore virale ricombinante adeno-associato (sierotipo 9) auto-complementare (scAAV).

I vettori virali ricombinanti adeno-associati (rAAV) hanno dimostrato un'elevata efficacia in numerosi studi preclinici; tuttavia, l'efficienza di questi vettori è limitata dal fatto che è necessario convertire il ssDNA in dsDNA affinché ci sia espressione. Per sintetizzare il filamento complementare gli rAAV utilizzano il macchinario della cellula ospite, come la DNA polimerasi e i fattori di replicazione e, inizialmente, ci si aspettava che questo avvenisse spontaneamente tramite la replicazione del DNA o i pathways di riparazione. Tuttavia, ciò non è stato osservato e per questo motivo la necessità della sintesi del filamento complementare risulta essere un fattore limitante per l'efficienza dei rAAV.

Sfruttando la tendenza dei virus adeno-associati a produrre genomi a ripetizione invertita dimerici durante il loro ciclo di replicazione, è possibile bypassare lo step che riguarda la sintesi del filamento complementare. Infatti, se i dimeri sono sufficientemente piccoli, possono essere impacchettati allo stesso modo dei genomi convenzionali di AAV e, le due metà della molecola di ssDNA possono ripiegarsi e appaiarsi per formare una molecola di dsDNA di lunghezza dimezzata. Ciò riduce ulteriormente la capacità di trasporto del transgene di un vettore virale già piccolo, ma offre un notevole vantaggio in termini di efficienza e velocità di insorgenza dell'espressione del transgene in quanto la conversione da ssDNA a dsDNA è indipendente dalla sintesi del DNA della cellula ospite.

A tal proposito, in diversi studi è stato osservato un aumento dell'efficienza di trasduzione di 10 volte maggiore da parte degli scAAV rispetto ai rAAV [4].

2.2 Progettazione ed espressione del vettore per il trasferimento genico

Per la progettazione del vettore gli autori hanno utilizzato un vettore virale ricombinante adeno-associato auto-complementare che contiene il cDNA del transgene umano SURF1 (hSURF1opt), la cui espressione è controllata dal promotore CBh (hybrid chicken β -actin promoter) e dall'ormone BGH (BGHpA). Quando si utilizzano i vettori scAAV (self-complementary vector), bisogna tener conto della loro ridotta capacità di impacchettamento, che è di circa 2.2 kb di DNA esogeno. È quindi importante combinare elementi minimi di promotore come elementi di regolazione e poliadenilazione in modo da massimizzare lo spazio rimanente per la sequenza codificante del transgene.

Generalmente i promotori più utilizzati in esperimenti di trasferimento genico sono CMV (promotore citomegalovirus) e CBA (promotore β -actina di pollo); questi forniscono un'espressione robusta e duratura in tutti i tipi di cellule. Tuttavia, le loro dimensioni li rendono poco adatti per i vettori scAAV e per questo motivo, nel corso degli anni, sono stati sviluppati delle nuove versioni di questi promotori.

Gli autori di questo studio hanno utilizzato il promotore CBh, il quale è stato sviluppato a partire dal promotore CBA a cui è stato sostituito l'introne SV40 con un introne ibrido formato al 5' dal sito di splicing donatore proveniente dal 5' UTR della β -actina di pollo e al 3' dal sito di splicing accettore proveniente da MVM (minute virus of mice).

Il promotore CBh è in grado di condurre un'espressione forte in tutti i tipi cellulari e, in particolare è risultato essere un promotore forte e ubiquitario per le applicazioni che riguardano il sistema nervoso centrale (SNC) [5].

L'utilizzo del promotore CBh facilita l'espressione universale della proteina funzionale SURF1 e, nonostante la sindrome di Leigh correlata a SURF1 sia una malattia neurodegenerativa, dove il cervello e il midollo spinale sono i tessuti maggiormente colpiti, il gene SURF1 è espresso in maniera ubiquitaria in tutti gli organi ed è quindi importante avere un promotore che ne permette l'espressione in tutti i tipi cellulari.

Nel plasmide utilizzato in questo studio, il gene hSURF1opt e il promotore CBh hanno delle dimensioni rispettivamente di 921 e 800 bp, adatte quindi alle capacità di impacchettamento dei vettori scAAV. Inoltre, il transgene è delimitato dalle ripetizioni terminali invertite di AAV2 (ITR) in cui il 5' UTR è mutato per eliminare l'elemento D, incluso il sito terminale di risoluzione, in modo da prevenire l'inizio della replicazione all'estremità 5'.

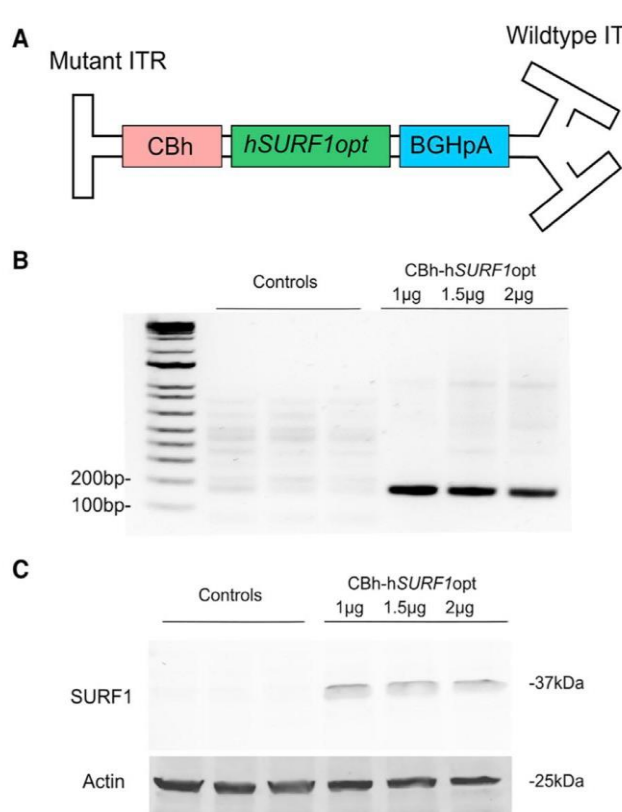


Figura 1. A) Diagramma schematico della cassetta di trasferimento genico con il promotore CBh, il cDNA del gene umano SURF1 ottimizzato e il BGHpA.

B) Real-time PCR di mRNA di SURF1 da cellule HEK293 trasfettate con il plasmide contenente l'hSURF1opt o con il plasmide di controllo CBh-GFP.

C) Western blot per verificare l'espressione della proteina SURF1 in cellule HEK293 trasfettate con il plasmide contenente l'hSURF1opt o con il plasmide di controllo CBh-GFP.

2.3 La somministrazione del vettore AAV9/hSURF1 migliora l'attività del complesso IV e riduce i livelli di lattato.

La proteina SURF1 gioca un ruolo essenziale nell'assemblaggio del complesso IV della catena respiratoria, motivo per cui, una diminuzione dell'attività di questo complesso è uno dei segni distintivi della sindrome di Leigh causata da SURF1. Inoltre, i pazienti affetti da questa sindrome mostrano spesso dei livelli elevati di lattato nel sangue.

Da studi precedenti è emerso che nei topi knockout (KO) per SURF1 l'attività del complesso IV è ridotta in diversi tessuti, mentre i livelli di lattato, specialmente dopo un'intensa attività fisica, risultano essere elevati rispetto ai topi wildtype (WT).

Per questo motivo, gli autori dell'articolo hanno voluto verificare se attraverso la somministrazione intratecale del vettore AAV9/hSURF1 era possibile recuperare l'attività del complesso IV nei vari tessuti colpiti dalla malattia come cervello, fegato e tessuto muscolare e se i livelli elevati di lattato nel sangue potevano essere corretti.

Per verificare se la somministrazione del vettore AAV9/hSURF1 permetteva di recuperare l'attività del complesso IV sono stati trattati 4 gruppi di topi tutti

knockout per SURF1 e ogni gruppo ha ricevuto dosi diverse del vettore tramite somministrazione intratecale.

Al primo gruppo di topi è stata somministrata la dose più alta (8×10^{11} vg/mouse, KO+ High), al secondo gruppo è stata somministrata una dose quattro volte minore della precedente (2×10^{11} vg/mouse, KO+Low) mentre, al terzo gruppo è stato somministrato il vettore vuoto, utilizzato come controllo (KO+Vehicle). Al quarto gruppo di topi è stata somministrata la dose elevata, ma a differenza del primo, questo gruppo ha ricevuto due dosi, una tramite iniezione intratecale e una tramite iniezione endovenosa (8×10^{11} vg+ 8×10^{11} vg) /mouse, KO+High+i.v), in modo da potenziare gli effetti del trattamento.

Tutti i topi sono stati trattati dopo quattro settimane dalla nascita e i tessuti sono stati esaminati quattro settimane dopo il trattamento. Come mostrato in **figura 2** l'attività del complesso IV (COX) nei topi knockout è ridotta di circa il 50% nel cervello e nel fegato rispetto ai topi WT, mentre nel muscolo si vede una riduzione del 35%.

I risultati ottenuti dopo il trattamento (**figura 2 A-D**) vedono un recupero dell'attività del complesso IV. Più nel dettaglio gli autori hanno visto che nel cervello la dose più bassa porta ad un incremento del 4% dell'attività COX, la dose più alta porta ad un incremento del 28% e la dose combinata somministrata sia per via intratecale che per via endovenosa porta ad un incremento del 31% (**figura 2A**). Nel cervelletto sia la dose più bassa che quella più alta portano solo ad un incremento, rispettivamente, del 10% e del 12% mentre la doppia somministrazione (i.t.+i.v.) porta ad un incremento del 20% dell'attività del complesso IV (**figura 2B**). Nel fegato si ha un recupero maggiore dell'attività del complesso IV; con la dose più bassa si ottiene un incremento del 43% rispetto ai topi knockout invece, tanto con la dose più alta che quella combinata (i.t.+i.v.) si ottiene un incremento del 65% (**figura 2C**). Infine, nel tessuto muscolare scheletrico si ha un recupero del 12% con la dose più bassa e un recupero del 26% e del 22%, rispettivamente, con la dose più alta e con la combinazione delle due vie di somministrazione (**figura 2D**).

I dati ottenuti in questo studio suggeriscono quindi, che sia la singola somministrazione intratecale della dose più alta che la dose combinata, somministrata sia per via intratecale che per via endovenosa, portano ad un recupero dell'attività del complesso IV nei topi knockout per SURF1. Inoltre, non c'è una significativa differenza nella percentuale di recupero dell'attività del complesso IV tra il gruppo che ha ricevuto una singola dose e il gruppo che ha ricevuto la dose combinata (i.t.+i.v.).

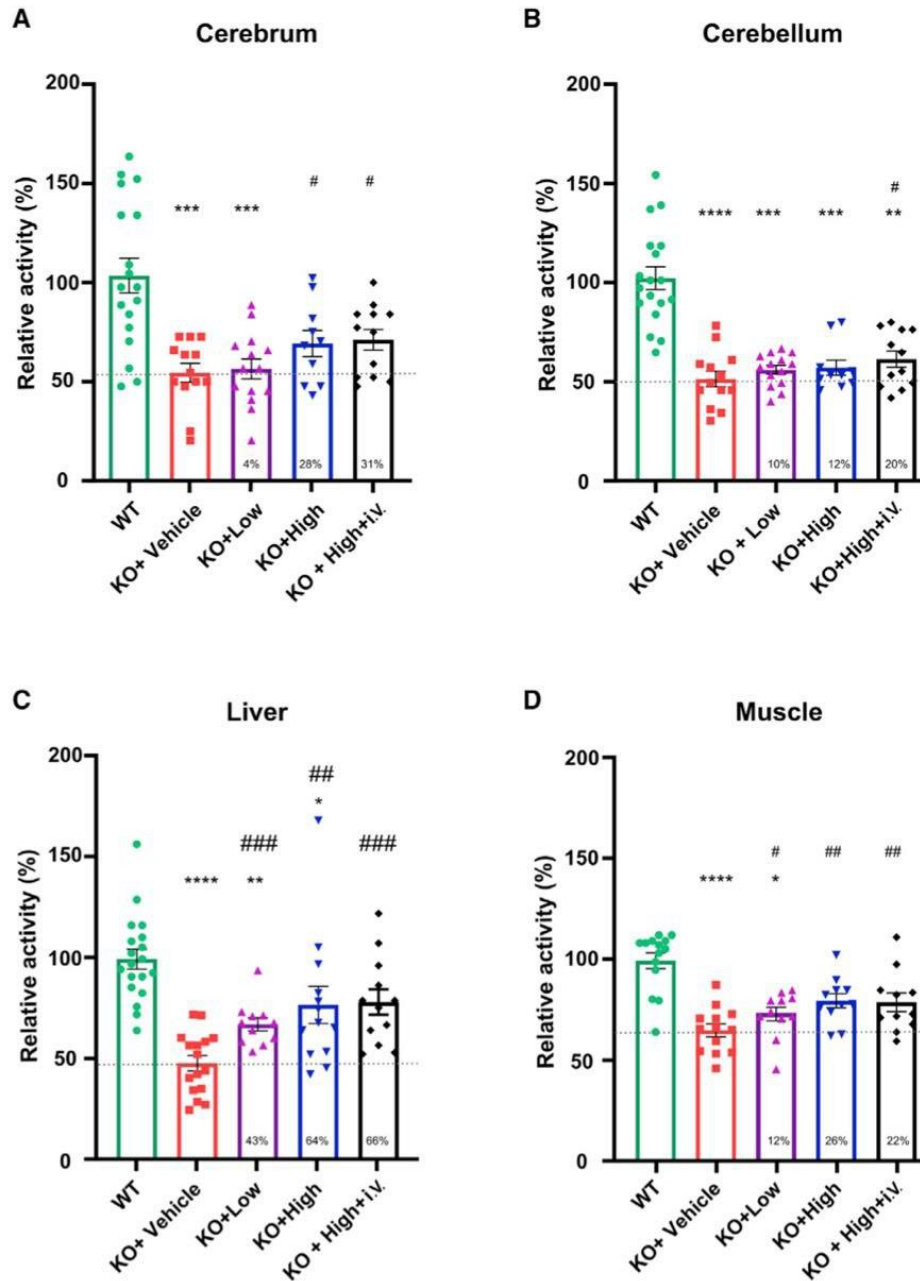


Figura 2. A-D Attività di COX nel cervello (A), nel cervelletto (B), nel fegato (C) e nel muscolo (D) del gruppo di topi WT e dei gruppi di topi knockout per SURF1 con i diversi trattamenti ricevuti. Tutti i dati sono stati standardizzati e ogni punto dei dati rappresenta una misurazione proveniente da un singolo animale con le barre che rappresentano alla media delle misurazioni (\pm errore standard), fornendo quindi una rappresentazione grafica della tendenza centrale dei dati. La linea tratteggiata indica il livello dell'attività del complesso IV nei topi SURF1 KO con il vettore vuoto; la percentuale di miglioramento per ciascun trattamento è indicata nella parte inferiore della colonna corrispondente.

Il trattamento con il vettore AAV9/hSURF1 è stato testato in altri due gruppi di topi per valutare se era in grado di correggere gli alti livelli di lattato nel sangue.

Ad un gruppo di topi è stata somministrata, tramite iniezione intratecale, la dose più alta del vettore (8×10^{11} vg/mouse), mentre al secondo gruppo è stata somministrata la dose più bassa (2×10^{11}).

I due gruppi sono stati testati a 10 settimane dalla nascita (6 settimane dopo il trattamento) e a 10 mesi dalla nascita (9 mesi dopo il trattamento) e i livelli di lattato sono stati misurati sia prima che dopo un'intensa attività fisica.

Dai risultati è emerso che non c'è differenza tra il tempo di corsa o i livelli di lattato a riposo tra i due gruppi ad entrambe le età. Tuttavia, come mostrato in **figura 3D**, la differenza dei livelli di lattato, misurati prima e dopo la corsa nei topi di 10 mesi (indicata come Δ Lactate) è significativamente più alta nei topi SURF1 KO rispetto ai topi WT.

Dopo la somministrazione del vettore AAV9/hSURF1, entrambi i gruppi di topi mostrano una riduzione dei livelli di lattato nel sangue, misurata come Δ Lactate, rispetto al valore misurato nei topi knockout.

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che sia la dose più bassa che quella più alta, somministrate tramite via intratecale, permettono di mitigare i livelli anormali di lattato dopo un intenso esercizio fisico nei topi knockout per SURF1.

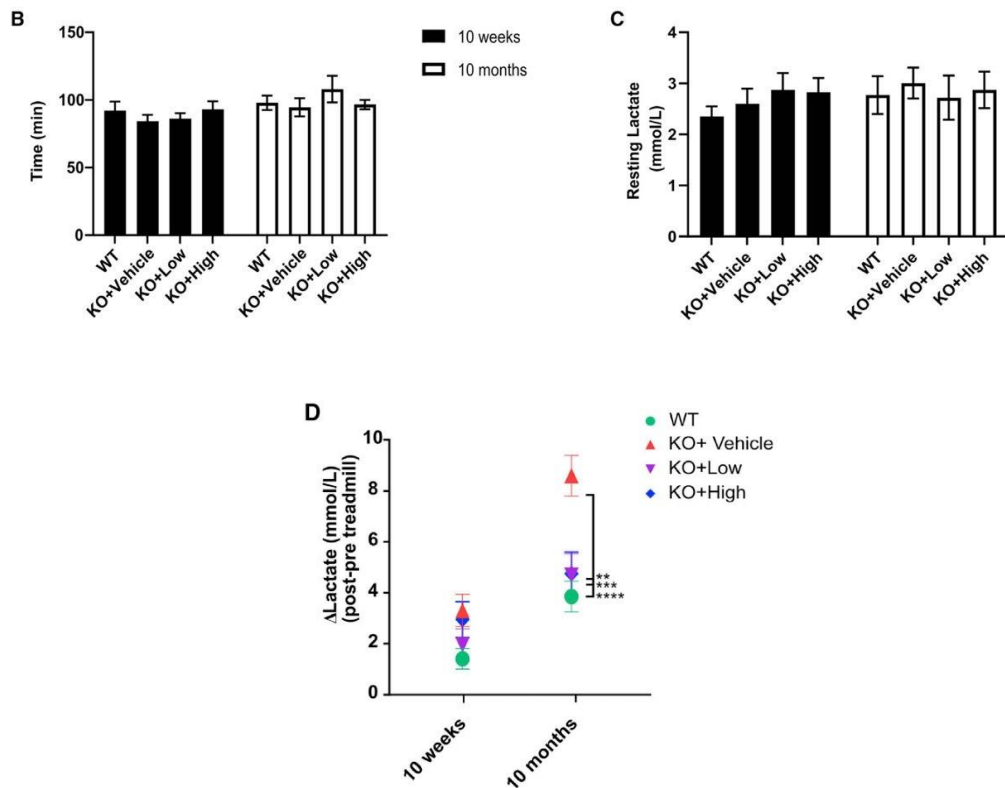


Figura 3. **B)** Tempo di corsa misurato nei gruppi di topi che hanno ricevuto dosi diverse del trattamento a due diverse età. **C)** Livelli di lattato nel sangue a riposo. **D)** Cambiamento dei livelli di lattato nel sangue dopo un intenso sforzo fisico come la corsa, misurati come Δ Lactate che indicano la differenza dei livelli di lattato pre e post corsa.

2.4 Misura dei livelli di espressione di SURF1 e della proteina MT-CO1

Per confermare i risultati ottenuti, gli autori hanno misurato i livelli di espressione di MT-CO1, proteina che costituisce il nucleo catalitico del complesso IV e dell'mRNA di hSURF1 nel cervello e nel midollo spinale dei topi che erano stati precedentemente trattati.

Hanno condotto degli studi di RNAscope utilizzando una sonda specifica per l'mRNA di hSURF1e hanno rilevato un buon livello di espressione nei topi precedentemente trattati con il vettore AAV9/hSURF1, in tutte le aree del cervello colpite dalla malattia. Inoltre, si è visto che non c'è una differenza significativa nei livelli di espressione tra il gruppo di topi che ha ricevuto una singola somministrazione intratecale del vettore e quello che ha ricevuto una somministrazione combinata (i.t.+i.v.).

Il livello di espressione della proteina MT-CO1 è stato, invece, rilevato tramite esperimenti di immunostochimica e si è visto che nei topi knockout per SURF1 risulta essere ridotto rispetto ai topi WT.

Come dimostrato nel grafico in **figura 4** il livello di espressione della proteina MT-CO1 nei topi trattati con il vettore vuoto è più basso rispetto ai topi WT mentre, nel gruppo di topi trattati con il vettore AAV9/hSURF1 il livello di espressione è intermedio.

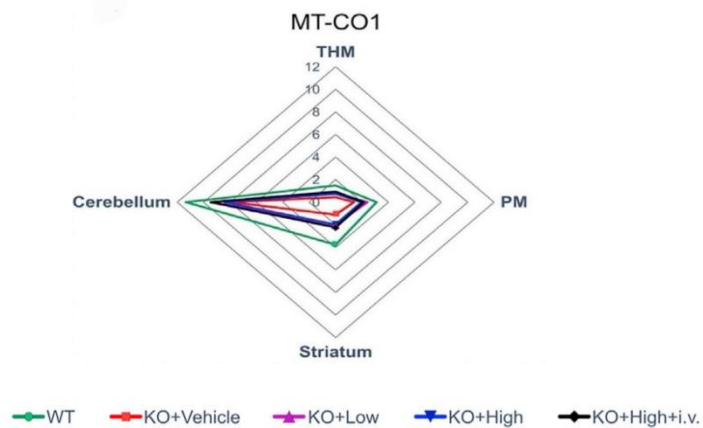


Figura 4. Rappresentazione dell'espressione della proteina MT-CO1 nei diversi tessuti. L'asse del grafico di Aracne rappresenta la percentuale di area colorata per la proteina MT-CO1.

CAPITOLO 3: METODI SPERIMENTALI

3.1 Western Blot

Il Western Blot è una tecnica immunochimica che si basa sull'utilizzo di anticorpi in grado di legare in maniera specifica uno o più epitopi presenti nella molecola antigene e permette di identificare proteine di interesse all'interno di un estratto proteico ottenuto da lisati di cellule o tessuti. Questa tecnica si basa sulla separazione differenziale di proteine tramite SDS-PAGE seguita dal trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa o PVDF (fluoruro di polivinilidene) mediante applicazione di un campo elettrico. Dopo il trasferimento, la membrana viene incubata con anticorpi specifici per le proteine di interesse. La rilevazione del blot può essere diretta, per cui la membrana viene incubata con l'anticorpo primario che viene marcato con il tracciante oppure indiretta tramite un sistema a doppio anticorpo; in quest'ultimo caso viene utilizzato un anticorpo primario che riconosce specificatamente la proteina di interesse e un anticorpo secondario, coniugato con un fluoroforo o un enzima, che riconosce la porzione costante dell'anticorpo primario. L'utilizzo del sistema di rilevazione a doppio anticorpo permette sia di ridurre i costi dell'esperimento sia di avere una rilevazione amplificata del segnale.

Gli autori dell'articolo preso in esame hanno utilizzato questa tecnica per verificare se il plasmide CBh-hSURF1 inducesse l'espressione della proteina SURF1 in cellule HEK293 trasfettate con il plasmide di interesse.

Dopo aver isolato le proteine dalle cellule precedentemente trasfettate, utilizzando il buffer RIPA integrato con inibitori delle proteasi e aver determinato la concentrazione proteica mediante metodo BCA, sono stati caricati 30 µg di campione in gel di poliacrilamide al 10% e successivamente trasferiti su membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono poi state incubate prima con l'anticorpo primario e dopo con il secondario, quest'ultimo coniugato con un fluoroforo e infine il blot è stato rilevato tramite immunofluorescenza.

3.2 Real-time PCR

La Real-time PCR, o quantitative PCR (qPCR), è una tecnica ampiamente utilizzata in biologia molecolare che permette di amplificare e quantificare specifiche sequenze di RNA o DNA in modo rapido e preciso. Rispetto alla PCR classica, nella real-time PCR è possibile monitorare ciclo per ciclo la quantità di amplicone prodotto nella miscela di reazione, seguendo tramite metodi ottici un cambiamento diretto o indiretto di fluorescenza legato alla produzione dell'amplicone stesso. È possibile stabilire una correlazione tra il numero di cicli di amplificazione necessari affinché diventi rilevabile il prodotto di PCR (questo prende il nome di ciclo soglia o Ct) e la quantità di template presente all'inizio della PCR nel campione; maggiore

è la quantità di template iniziale e minore sarà il valore di Ct, ovvero ci vorrà un numero di cicli di amplificazione minore affinché la fluorescenza diventi rilevabile. In questo modo si può determinare la quantità assoluta di un certo template o il rapporto di quantità tra template differenti e quindi stabilire il livello di espressione di un trascritto in un campione o in campioni differenti.

Gli autori dell'articolo hanno eseguito una qPCR per verificare la presenza dell'mRNA di SURF1 in cellule HEK293 trasfettate con il plasmide CBh-hSURF1.

3.3 Analisi dell'attività del complesso IV

Per testare l'attività del complesso IV dopo il trattamento con il vettore AAV9/hSURF1, gli autori hanno utilizzato il *Complex IV Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit* (Abcam, Cambridge, MA, USA), si tratta di un metodo colorimetrico che permette di determinare l'attività della *citocromo c ossidasi*.

Per svolgere le analisi, i topi sono stati trattati con PBS freddo a quattro settimane post trattamento e successivamente i tessuti sono stati estratti e posti in ghiaccio secco e dopo tutti i tessuti sono stati conservati a -80°C fino all'uso.

Dopo aver isolato i mitocondri, l'enzima citocromo c ossidasi (COX) è stato immunocatturato all'interno dei pozzetti della micropiastra e l'attività è stata determinata colorimetricamente seguendo l'ossidazione del citocromo c ridotto (substrato dell'enzima COX) mediante la variazione di assorbanza a 550 nm. L'assorbanza di ogni campione è stata misurata una volta al minuto per 120 minuti e l'attività di COX è stata determinata come il tasso iniziale di diminuzione osservato.

Per l'attività di COX misurata nei diversi gruppi di topi i saggi sono stati eseguiti in lotti multipli, nei quali è stato incluso almeno un topo WT e un topo che aveva ricevuto il trattamento con il vettore vuoto. Ciascun punto dati è stato poi normalizzato alla media di tutta l'attività COX dei topi WT ottenendo, in questo modo, l'attività COX relativa.

3.4 Misura dei livelli di lattato

I livelli di lattato nel sangue dopo un intensivo esercizio fisico sono stati misurati utilizzando l'*UTSW Metabolic Phenotyping Core*, un test in grado di fornire misure analitiche e fenotipiche all'avanguardia che permette di effettuare misurazioni del tasso metabolico basale e dell'attività fisica, di valutare la capacità di esercizio massimale utilizzando regimi progressivi di tapis roulant in combinazione con un sistema *Oxymax* per il monitoraggio del consumo di ossigeno e della produzione di anidride carbonica durante l'esercizio fisico [6].

I topi sono stati sottoposti ad un intensivo sforzo fisico mediante corsa su un tapis roulant per 3 giorni. In particolare, durante i primi due giorni i topi hanno acquisito confidenza con il tapis roulant facendo delle piccole sessioni di esercizio.

Il primo giorno hanno fatto 5 minuti di riposo sul tapis roulant seguiti da una corsa di 5 minuti ad una velocità di 8m/min e poi per altri 5 minuti alla velocità di 10 m/min mentre il secondo giorno hanno effettuato sempre un periodo di riposo di 5 minuti sul tapis roulant, seguito da due sessioni di corsa a velocità progressive di 10 m/min e 12 m/min. Il terzo giorno la sessione è iniziata con 5 minuti sul tapis roulant a riposo, dopo hanno iniziato la corsa con una velocità iniziale di 10 m/min per 40 minuti seguiti da un incremento progressivo della velocità fino ad arrivare a 13 m/min ed infine sono stati portati a cedimento aumentando la velocità di corsa di 1m/min ogni 5 minuti. Il tempo di resistenza è stato misurato come il momento in cui i topi rimanevano nella rete per la scossa elettrica per 5 secondi consecutivi senza riprendere la corsa. Gli autori hanno prelevato una goccia di sangue dalla coda e hanno misurato la concentrazione di lattato nel sangue utilizzando il misuratore Lactate Plus (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA).

3.5 RNAscope

Per misurare i livelli dell'mRNA di SURF1 nei topi che hanno ricevuto il trattamento con il vettore AAV9/hSURF1 gli autori hanno utilizzato la tecnica dell'RNAscope, una tecnica innovativa di ibridazione *in situ* di RNA.

Rispetto alle tecniche convenzionali di ibridazione *in situ* di RNA, che mancano della sensibilità e specificità necessaria per ottenere dei risultati efficaci ed affidabili, l'RNAscope è stata progettata per amplificare segnali specifici del bersaglio permettendo, allo stesso tempo, di ridurre il rumore di fondo e migliorando quindi, il rapporto segnale-rumore.

La particolarità di questa tecnica risiede nella progettazione della sonda target; viene, infatti, utilizzato un sistema in cui due sonde indipendenti, chiamate doppie sonde Z, devono ibridarsi in tandem alla sequenza target affinché il segnale di amplificazione sia rilevabile. L'ibridazione in tandem delle due sonde indipendenti ad un bersaglio non specifico è molto improbabile, motivo per il quale questo sistema garantisce un'amplificazione selettiva dei segnali specifici del bersaglio, andando anche a limitare e ridurre i rumori di fondo.

La tecnica dell'RNAscope prevede quattro fasi principali: nella prima fase le cellule o i tessuti vengono fissati e permeabilizzati in modo da permettere alle sonde target di penetrare all'interno di essi, nella seconda fase avviene l'ibridazione a coppia delle sonde oligonucleotidiche specifiche sull'RNA target, nella terza fase avviene l'amplificazione delle molecole target e infine, nella quarta e ultima fase, avviene la rilevazione del segnale tramite microscopio a fluorescenza o tramite microscopio ottico in campo chiaro. [7]

Nell'articolo preso in esame i livelli dell'mRNA di SURF1 sono stati misurati utilizzando il kit RNAscope 2.5 HD (Advanced Cell Diagnostic, Newark, CA, USA) partendo dai tessuti prelevati dal cervello e dal midollo spinale degli animali precedentemente trattati.

3.6 Immunoistochimica (IHC)

L'immunoistochimica è una tecnica basata sull'interazione antigene-anticorpo che permette di individuare proteine specifiche in sezioni di tessuto o monostrati di cellule in coltura fissati su vetrino. Il sistema di rilevazione è basato sull'utilizzo di due anticorpi, il primo è specifico per la proteina di interesse mentre il secondo si lega al primo ed è coniugato ad un enzima che, quando reagisce con un substrato opportuno, produce un prodotto colorato che precipita e colora il preparato; solitamente come enzima viene utilizzata la perossidasi e come substrato cromogeno la diaminobenzidina (DAB).

Questa tecnica è stata utilizzata dagli autori dell'articolo per rilevare i livelli di espressione della proteina MT-CO1 nel cervello e nel midollo spinale dei topi WT e dei topi che sono stati trattati con il vettore AAV9/hSURF1.

CAPITOLO 4: DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'obiettivo dell'articolo su cui si basa questa tesi è dimostrare come la terapia genica basata sul vettore AAV9/hSURF1 possa essere un potenziale trattamento terapeutico per i pazienti affetti da sindrome di Leigh, causata da mutazioni nel gene nucleare SURF1.

Lo scopo della terapia è quello di sostituire il gene SURF1 mutato con una copia normale di tale gene, trasportata mediante l'utilizzo dei vettori virali ricombinanti adeno-associati.

Gli esperimenti sono stati condotti su modelli murini knockout per SURF1 e i risultati ottenuti dimostrano che una singola somministrazione intratecale del vettore AAV9/hSURF1 porta ad un miglioramento dell'attività del complesso IV di circa il 20%-30% nei tessuti testati e ad una riduzione dei livelli elevati di lattato nel sangue indotti da eccessivo esercizio fisico.

Inoltre, per confermare i risultati ottenuti sono stati condotti esperimenti di RNAscope e immunoistochimica per misurare i livelli di espressione dell'mRNA di SURF1 e di MT-CO1, proteina il cui assemblaggio sembra essere influenzato da SURF1.

I dati ottenuti mostrano una buona espressione sia dell'mRNA di SURF1 che della proteina MT-CO1 nel cervello e nel midollo spinale, regioni maggiormente colpite dalla malattia nei topi knockout che hanno ricevuto il trattamento.

Proseguendo con gli esperimenti, alcuni di essi sono stati condotti per poter valutare la sicurezza a lungo termine del trattamento, importante affinché in futuro la terapia possa essere applicata ai pazienti con sindrome di Leigh. Per questo motivo, sono state eseguite analisi biochimiche e istopatologiche su topi C57BL/6J wild-type 12 mesi dopo aver ricevuto il trattamento con il vettore AAV9/hSURF1 e i dati mostrano che il trattamento non porta a cambiamenti nello stato di salute generale dei topi.

È possibile, quindi, affermare che il trattamento terapeutico proposto è sicuro nei topi per almeno un anno dopo la somministrazione.

Un aspetto su cui prestare particolare attenzione, affinché la terapia genica sia efficiente, riguarda la scelta del vettore e della via di somministrazione.

Avendo le malattie mitocondriali manifestazioni principalmente neurologiche è importante che il vettore e la via di somministrazione scelti assicurino una distribuzione estesa e uniforme nel sistema nervoso centrale (SNC). A tal proposito, diversi studi hanno dimostrato che il vettore AAV9 si rivela essere la scelta più adatta in quanto distribuisce ampiamente il transgene in tutto il SNC dopo un'unica iniezione intratecale.

Tuttavia, in un altro studio, in cui il vettore AAV9 è stato utilizzato per veicolare il gene NDUFS4, la cui mutazione porta a difetti nel complesso I della catena respiratoria, si è visto che una singola somministrazione intravascolare (i.v.) del vettore AAV9^{NDUFS4} porta ad un prolungamento della vita dei topi solo da 45 a 100 giorni, con un rapido peggioramento delle condizioni negli ultimi due giorni di vita. Per risolvere ciò, è stata effettuata una doppia somministrazione del vettore AAV9^{NDUFS4}, sia tramite via intravascolare che tramite via intracerebroventricolare, e gli animali così trattati hanno mostrato un'aspettativa di vita nettamente superiore rispetto al gruppo di topi che aveva ricevuto la singola somministrazione intravascolare [8]. Questo dimostra quanto sia importante la scelta del vettore e della via di somministrazione più adatta affinché la terapia sia efficiente.

Uno dei limiti maggiori nella comprensione dei meccanismi alla base delle malattie mitocondriali e nello sviluppo di trattamenti terapeutici efficaci, riguarda la mancanza di organismi modello che siano in grado di riprodurre i sintomi osservati nei pazienti.

In particolare, i modelli murini knockout per il gene SURF1 non mostrano il fenotipo neurologico tipico della sindrome di Leigh e inoltre, mostrano una durata della vita anche maggiore rispetto ai modelli wildtype. Per questo motivo, gli autori dell'articolo sono stati costretti a effettuare letture biochimiche per verificare l'efficacia del trattamento.

Il silenziamento del gene SURF1 in altri organismi modello come *Drosophila* e *Zebrafish* causa, rispettivamente, una diminuzione dell'attività del complesso IV senza nessun difetto neurologico e difetti nello sviluppo dei tessuti endotermici e nel sistema nervoso periferico. Nei modelli suini, invece, si ha un grave fenotipo letale con ritardo nello sviluppo del sistema nervoso centrale senza evidenti segni di neurodegenerazione e senza nessuna carenza nell'attività del complesso IV.

Le differenze osservate tra i pazienti affetti da sindrome di Leigh e i diversi organismi modello potrebbero essere il risultato di una maggiore dipendenza, per le cellule umane, dalla funzione del gene SURF1 per l'assemblaggio del complesso IV. [9]

Un altro motivo potrebbe risiedere nel fatto che la funzione della proteina SURF1, in altre specie, risulta essere accessoria o ridondante e può essere sostituita da altre proteine. Dunque, la diversa gravità del fenotipo associato a mutazioni nel gene

SURF1 può dipendere dall'efficacia dei meccanismi compensatori genetici o epigenetici che agiscono nei diversi organismi. [10]

Infine, a fronte degli studi presentati, si può affermare che, essendo la sindrome di Leigh una malattia neurodegenerativa, una diagnosi e un intervento precoce, ancor prima dell'insorgenza dei sintomi, permettono di ottenere un maggiore beneficio terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

1. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16080. Published 2016 Oct 20. doi:10.1038/nrdp.2016.80
2. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol*. 2016;79(2):190-203. doi:10.1002/ana.24551
3. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther*. 2001;8(16):1248-1254. doi:10.1038/sj.gt.3301514
4. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther*. 2008;16(10):1648-1656. doi:10.1038/mt.2008.171
5. Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum Gene Ther*. 2011;22(9):1143-1153. doi:10.1089/hum.2010.245
6. Boston University Chobanian & Avedisian School of Medicine <https://www.bumc.bu.edu/camed/research/cores/metabolic-phenotyping-core/> (data consultazione 15/05/2024)
7. Wang F, Flanagan J, Su N, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2012;14(1):22-29. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.08.002
8. Corrà S, Cerutti R, Balmaceda V, Viscomi C, Zeviani M. Double administration of self-complementary AAV9NDUFS4 prevents Leigh disease in *Ndufs4*^{-/-} mice. *Brain*. 2022;145(10):3405-3414. doi:10.1093/brain/awac182
9. Inak G, Rybak-Wolf A, Lisowski P, et al. Defective metabolic programming impairs early neuronal morphogenesis in neural cultures and an organoid model of Leigh syndrome. *Nat Commun*. 2021;12(1):1929. Published 2021 Mar 26. doi:10.1038/s41467-021-22117-z
10. Dell'agnello C, Leo S, Agostino A, et al. Increased longevity and refractoriness to Ca(2+)-dependent neurodegeneration in *Surf1* knockout mice. *Hum Mol Genet*. 2007;16(4):431-444. doi:10.1093/hmg/ddl477

APPENDICE

Ling Q, Rioux M, Hu Y, Lee M, Gray SJ. Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene replacement therapy for *SURF1*-related Leigh syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021; 23:158-168. Published 2021 Sep 7.
doi:10.1016/j.omtm.2021.09.001

Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene replacement therapy for *SURF1*-related Leigh syndrome

Qinglan Ling,¹ Matthew Rioux,¹ Yuhui Hu,¹ MinJae Lee,² and Steven J. Gray¹

¹Department of Pediatrics, UTSW Medical Center, Dallas, TX 75390, USA; ²Department of Population and Data Science, UTSW Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

***SURF1* (surfeit locus protein 1)-related Leigh syndrome is an early-onset neurodegenerative disorder, characterized by reduction in complex IV activity, resulting in disrupted mitochondrial function. Currently, there are no treatment options available. To test our hypothesis that adeno-associated viral vector serotype 9 (AAV9)/human *SURF1* (h*SURF1*) gene replacement therapy can provide a potentially meaningful and long-term therapeutic benefit, we conducted preclinical efficacy studies using *SURF1* knockout mice and safety evaluations with wild-type (WT) mice. Our data indicate that with a single intrathecal (i.t.) administration, our treatment partially and significantly rescued complex IV activity in all tissues tested, including liver, brain, and muscle. Accordingly, complex IV content (examined via MT-CO1 protein expression level) also increased with our treatment. In a separate group of mice, AAV9/h*SURF1* mitigated the blood lactic acidosis induced by exhaustive exercise at 9 months post-dosing. A toxicity study in WT mice showed no adverse effects in either the in-life portion or after microscopic examination of major tissues up to a year following the same treatment regimen. Taken together, our data suggest a single dose, i.t. administration of AAV9/h*SURF1* is safe and effective in improving biochemical abnormalities induced by *SURF1* deficiency with potential applicability for *SURF1*-related Leigh syndrome patients.**

INTRODUCTION

Leigh syndrome (LS) (OMIM: 256000), or subacute necrotizing encephalomyopathy, is a recessively early onset mitochondrial disorder. Patients show asymmetric necrotic lesions in basal ganglia, diencephalon, brain stem, and spinal cord, and patients generally develop motor and neurological disorders during early infancy.^{1,2} One of the most common causes of LS is from loss-of-function mutations in the nuclear genome coding the *SURF1* (surfeit locus protein 1) gene.^{3,4} Mutations of *SURF1* are typically autosomal recessive, in which a patient inherits one defective copy from each healthy carrier parent.⁴ *SURF1* protein localizes in the inner mitochondrial membrane and is predicted to form two transmembrane helices with a connecting loop facing the intermembrane space.⁵ Evidence suggested that *SURF1* may contribute to assembly or stabilization of complex IV (cIV)/cytochrome *c* oxidase (COX), the fourth complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) system.^{6,7} In most cases, pa-

tients with *SURF1*-related LS show 10%–20% remaining COX activity as examined with muscle or skin fibroblasts.^{1,8,9} Additionally, 81% of patients show elevated blood lactate levels.⁹

So far, there is no approved treatment for this devastating disease besides palliative care. Therapies for most patients with mitochondrial disorders in general are limited to preventing or treating complications. During the last two decades, viral vector-based gene therapy has been extensively explored as a potential treatment for genetic diseases.¹⁰ In particular, the recombinant adeno-associated viral vector (AAV) has been shown in numerous studies to be a safe and efficacious vector for delivering a transgene to various tissues with tissue specificity from different serotypes.¹¹ The AAV serotype 9 (AAV9) has become a favored choice for CNS gene transfer, due to its ability to mediate widespread transgene expression across the entire CNS tissues of both rodents and non-human primates (NHPs).^{12–15} The AAV9 vector has been used in clinical trials for multiple neurological diseases including spinal muscular atrophy (SMA), which was approved in 2017 by the US Food and Drug Administration (FDA), GM1 gangliosidosis (ClinicalTrials.gov: NCT03952637), CLN7 Batten disease (ClinicalTrials.gov: NCT04737460), and several others.¹¹ Our group developed the first-in-human intrathecal (i.t.)-administered AAV clinical trial for giant axonal neuropathy starting in 2015 (ClinicalTrials.gov: NCT02362438).^{16,17}

In this study, we developed a gene transfer vector, in which AAV9 is used to deliver a codon-optimized human *SURF1* (h*SURF1*opt) gene (AAV9/h*SURF1*) as a potential gene therapy for *SURF1*-related LS patients. We used the *SURF1* knockout (KO) mice as the disease model to evaluate the efficacy of the vector. The mouse model has a frameshift mutation in exon 7 of *SURF1*, which causes a total loss of *SURF1* protein expression.¹⁸ Previous studies demonstrated several manifestations of dysfunctional mitochondria such as about 50% reduced complex IV/ COX activity, reduced MT-CO1 (mitochondria-encoded COX subunit 1) protein expression in multiple organs

Received 25 June 2021; accepted 1 September 2021;
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.09.001>.

Correspondence: Steven J. Gray, Department of Pediatrics, UTSW Medical Center, Dallas, TX 75390, USA.

E-mail: steven.gray@utsouthwestern.edu



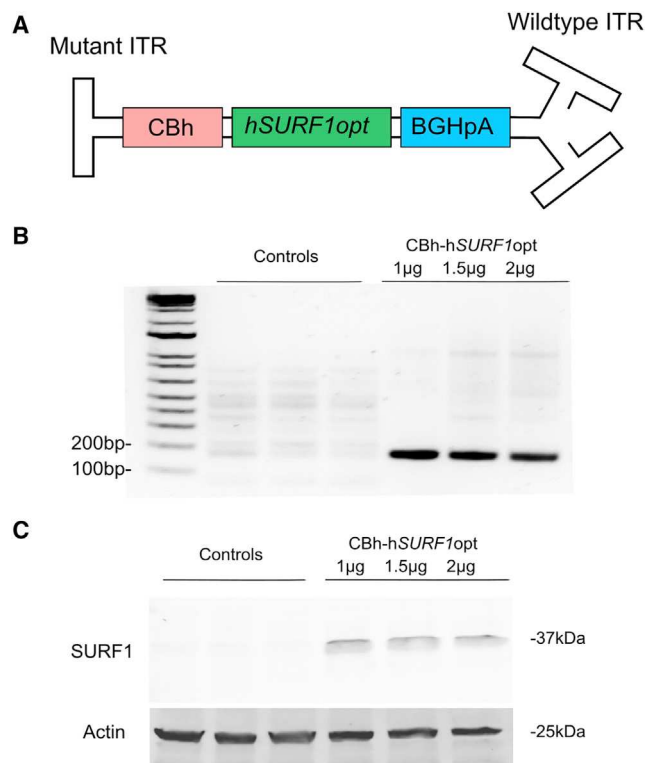


Figure 1. AAV9/hSURF1 vector design for expressing human SURF1

(A) Schematic diagram of the AAV9/hSURF1 gene transfer cassette using a CBh promoter, the full-length, codon-optimized human SURF1 cDNA, and the BGH poly(A) tail. (B) RT-PCR of SURF1 mRNA from HEK293 cells transfected with CBh-hSURF1opt plasmid or CBh-GFP control plasmid for 48 h. (C) Western blot of SURF1 expression from HEK293 cells transfected with CBh-hSURF1opt plasmid or CBh-GFP control plasmid for 48 h.

compared to age-matched wild-type (WT) mice, and exercise-induced blood lactic acidosis.^{18–20} This experimental therapy is designed to broadly express the hSURF1opt gene in the CNS and thereby rescue the reduced COX activity and MT-CO1 protein level in disease-related tissues, as well as mitigate blood lactic acidosis induced by exhaustive exercise. To explore potential risks associated with the treatment, we also conducted a non-good laboratory practice (GLP) toxicology study in WT C57BL/6J mice utilizing the same dose and administration routes as we did in the efficacy study. Our data suggest that a single dose of i.t. delivered AAV9/hSURF1 is safe, effective, and sufficient to mitigate SURF1 deficiency-related dysfunctions in the SURF1 KO mouse model. These findings strongly support that gene replacement therapy through i.t. administration of AAV9/hSURF1 has the potential for further development as a treatment for SURF1-related LS patients.

RESULTS

Design and expression of a gene transfer vector expressing SURF1

The gene transfer vector was designed as a self-complementary AAV9 (scAAV9) vector carrying hSURF1opt transgene cDNA, the expres-

sion of which is controlled by the hybrid chicken β -actin (CBA) (CBh) promoter and the bovine growth hormone (BGH) polyadenylation (poly(A)) (BGHpA) tail (Figure 1A). The modified scAAV9 was chosen here, as it was suggested to transduce 10-fold more cells than did single-stranded AAV9 (ssAAV9).¹⁴ The transgene insert is bounded by the AAV2 inverted terminal repeats (ITRs), in which the 5' ITR is mutated to delete the D element, including the terminal resolution site, to prevent the initiation of replication from the 5' end.²¹ Thus, the packing capacity of scAAV9 is limited to only about 2.2 kb of foreign DNA. In this plasmid, the size of the hSURF1opt gene and CBh promoter are 921 and 800 bp, respectively, which are small enough to fit into a self-complementary genome configuration with the BGHpA. The CBh promoter was chosen, as it induced ubiquitous, sustained, and relatively strong hSURF1opt expression.²² Even though SURF1-related LS is a neurodegenerative disease, with the brain and spinal cord being the most damaged tissue, SURF1 is ubiquitously expressed in all organs. Thus, use of the CBh promoter facilitates universal expression of functional SURF1 protein. CBh-hSURF1opt plasmid was tested by transfecting it into HEK293 cells, and Figures 1B and 1C show that the plasmid induced both mRNA and protein expression in HEK293 cells.

Intrathecal delivery of AAV9/hSURF1 improved COX activity deficiency

As SURF1 plays a critical role in COX holoenzyme assembly, COX activity deficiency becomes one of the hallmarks of SURF1-related LS patients.^{6,9} In clinical studies, COX activity is generally measured in muscle or skin biopsies of patients, which show 20%–30% remaining COX activity.⁹ Previous studies suggest that COX activity was reduced in multiple tissues of SURF1 KO mice compared with WT mice.^{18,19,23} Thus, we intended to confirm these findings and examine whether AAV9/hSURF1 can rescue COX activity deficiency in brain (cerebrum and cerebellum), liver, and muscle tissues. SURF1 KO mice were treated with AAV9/hSURF1 at a highest dose (8×10^{11} vector genomes [vg]/mouse, KO+High), 4-fold lower dose (2×10^{11} vg/mouse, KO+Low), and vehicle (KO+Vehicle) through i.t. administration. A fourth group of mice were treated with a combination of high dose i.t. and the same dose intravenously (i.v.) (8×10^{11} vg + 8×10^{11} vg)/mouse, KO+High+i.v.), as other studies suggested that combining two different administration routes may enhance the treatment effects.²⁴ All mice were treated at 4 weeks of age and tissues were collected 4 weeks later. As shown in Figure 2, COX activity of SURF1 KO mice was reduced approximately 50% compared with that of WT mice in all tissues except muscle, which was reduced by 35% ($p < 0.001$). These results are consistent with previous findings.^{18,25} In the cerebrum (Figure 2A), the low-dose treatment increased by 4% of the KO+Vehicle level ($p = 0.3896$ compared to the KO+Vehicle group), and the high-dose treatment and combination of high dose i.t. and i.v. treatment increased by 28% and 31%, respectively, of the level of the KO+Vehicle group ($p = 0.0362$ and 0.0127 , respectively). In the cerebellum (Figure 2B), both the low-dose and high-dose treatments increased COX activity by 10% and 12% ($p = 0.1528$ and 0.1594 , respectively, compared with the KO+Vehicle group), while treating the mice i.v. along with high-dose i.t.

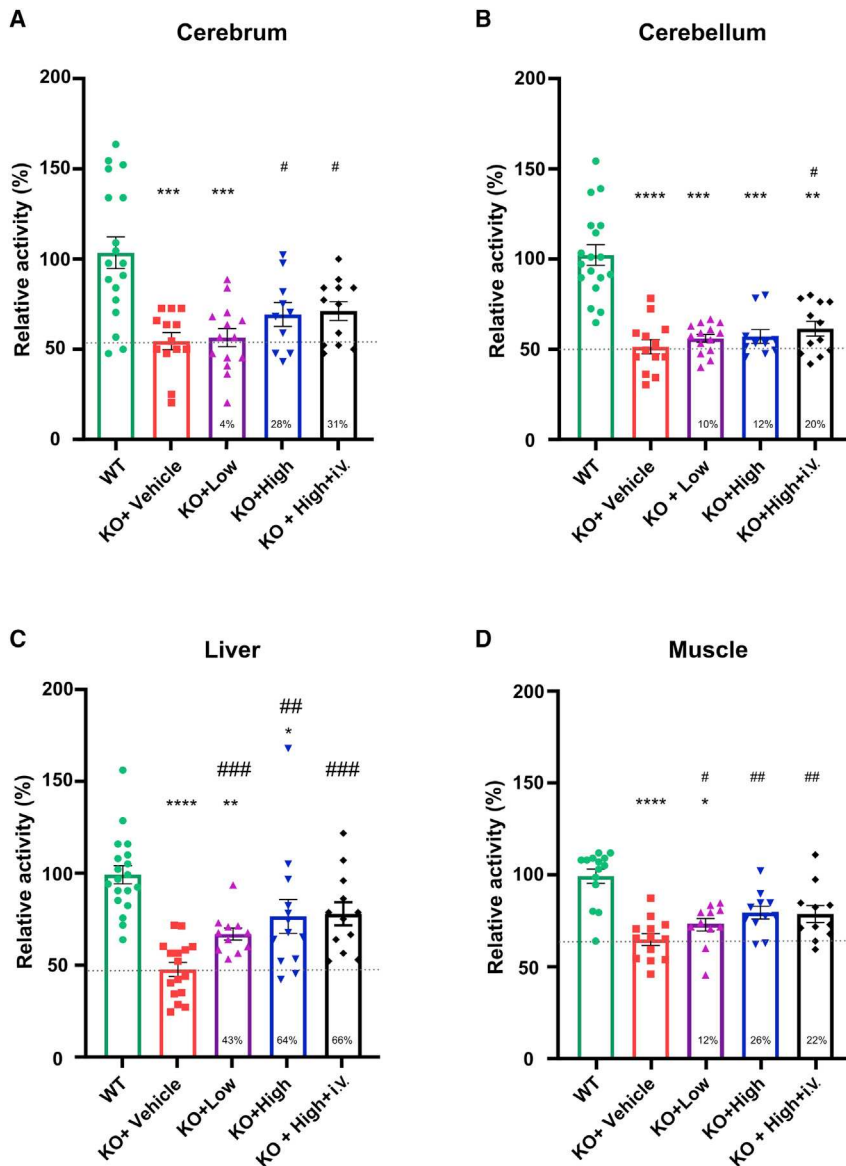


Figure 2. AAV9/hSURF1 improved COX activity in SURF1 KO mice at 4 weeks post-injection

(A–D) COX activity of cerebrum (n = 10–18 per group) (A), cerebellum (n = 10–18 per group) (B), liver (n = 5–8 per group) (C), and muscle (n = 10–14 per group) (D) of WT and SURF1 KO mice with assigned treatments. All data were normalized to the average of WT mice. Each data point represents measurement from an individual animal, with bars representing the mean \pm SEM (standard error of the mean). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with WT mice using Dunn's multiple comparison test following a Kruskal-Wallis test for non-normal data, or Tukey's multiple comparison method following an ordinary one-way ANOVA for normal data. A Shapiro-Wilk's test was used for the normality of the data distribution, and a Brown-Forsythe test was used for homogeneity of variance. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with KO+Vehicle mice using a one-tailed Student's t test. A dashed line indicates the level of KO+Vehicle, and the percentage of improvement compared with the KO+Vehicle group from each treatment is provided at the bottom of the respective column.

increased COX activity by 20% ($p = 0.0453$ compared with the KO+Vehicle group). In the liver, as shown in Figure 2C, COX activity was increased by 43% with low-dose treatment ($p = 0.0007$ compared with the KO+Vehicle group). Both the high dose and the combination of i.t. and i.v. treatment increased the activity by about 65% ($p = 0.0022$ and $p = 0.0001$, respectively, compared with the KO+Vehicle group). As many SURF1-related LS patients also show muscular dystrophy, we also tested the change of COX activity in skeletal muscle. As shown in Figure 2D, COX activity of KO mice showed a 35% reduction compared with WT mice ($p < 0.0001$), and all of our treatments showed significant improvement in COX activity compared with vehicle-treated KO mice ($p = 0.0497$ for KO+Low, $p = 0.001$ for KO+High, and $p = 0.0089$ for KO+High+i.v.). Thus, our data showed that both high-dose treatment through i.t. and a combination

of i.t. and i.v. treatment are effective in improving COX activity deficiency. However, the additional i.v. dose did not show further improvement in any tissue tested over that achieved with a single i.t. dose alone. Taken together, these data suggest that treating SURF1 KO mice with a single high dose of AAV9/hSURF1 through i.t. administration is effective in increasing COX activity in target tissues, which is the underlying driver of the disease pathology.

SURF1 mRNA expression and COX content level in the CNS of mice

To support our findings on COX activity, we evaluated hSURF1opt mRNA expression and MT-CO1 protein expression level in the brain and spinal cord using the tissues from the same

mice. A customized probe was used in RNAscope to specifically detect mRNA of the codon-optimized hSURF1 in AAV9/hSURF1-treated mice. Figure 3A shows representative images of hSURF1opt mRNA and MT-CO1 staining. As the probe was specific to hSURF1opt, no signal could be detected in WT or vehicle-treated KO mice. Human SURF1opt mRNA was successfully expressed in all disease-relevant brain areas, the cervical spinal cord (furthest from the injection site), and the lumbar spinal cord (closest to the injection site) of AAV9/hSURF1-treated animals (Figure 3B). Similar to the effects on COX activity, the combinational treatment of i.t. and i.v. administration did not significantly improve the mRNA expression level over i.t. administration alone. Previous studies have shown that the expression level of MT-CO1 protein correlates with COX activity,²⁶ and in SURF1 KO mice, the expression of MT-CO1 is reduced.²⁰

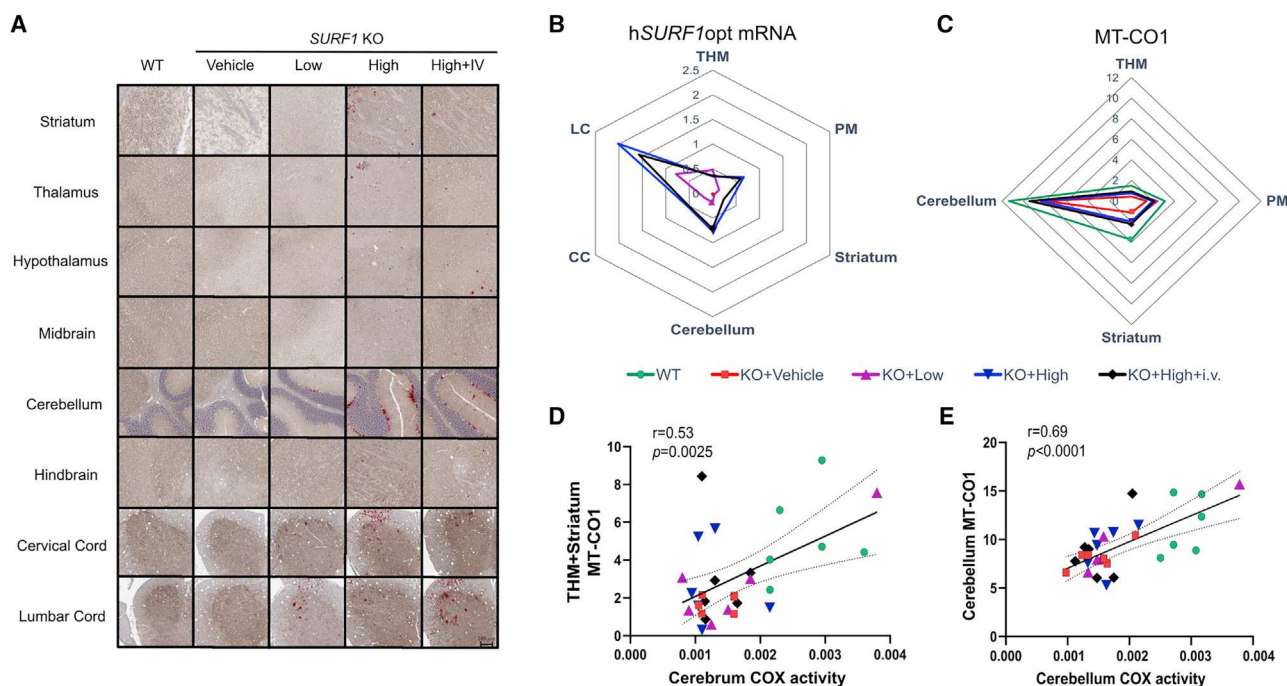


Figure 3. hSURF1opt mRNA and MT-CO1 protein expression in CNS tissues

(A) Representative images of hSURF1opt mRNA staining in brain areas (striatum, hypothalamus, thalamus, midbrain, cerebellum, and hindbrain) and spinal cord sections (cervical cord and lumbar cord). The red dots are positive mRNA staining. The same brain slice was stained with MT-CO1 protein using IHC staining, which shows the brown color. Under the same treatment group, all images are from a single animal and are representative of all animals. (B) hSURF1opt mRNA is expressed in the CNS tissues of SURF1 KO mice. The axis of the Arachne plot represents the percent area staining positive for hSURF1opt. The abundance of hSURF1opt mRNA in WT and KO+Vehicle groups are close to 0 percent. THM, thalamus, hypothalamus, and midbrain; PM, pons and medulla; CC, cervical cord; LC, lumbar cord. See also Figure S1. (C) Abundance of MT-CO1 protein expression. The axis of the Arachne plot represents the percent area staining positive for MT-CO1 protein. See also Figure S2. (D and E) The correlation between percent area staining positive for MT-CO1 protein expression with COX activity of affected regions in cerebrum and cerebellum.

As shown in Figure 3C, the expression of MT-CO1 is lowest in vehicle-treated KO mice and highest in WT mice, while the levels of AAV9/hSURF1-treated animals were between those two. This trend of improvement in MT-CO1 expression is significantly correlated with the trend of COX activity level in both cerebrum (Figure 3D) and cerebellum (Figure 3E). Graphs with individual values from all the analyses are shown in Figure S1 (hSURF1opt mRNA) and Figure S2 (MT-CO1 expression).

Intrathecal delivery of AAV9/hSURF1 ablated exhaustive exercise-induced lactic acidosis in SURF1 KO mice

LS patients with SURF1 deficiency often show elevated blood lactate. Previous studies reported that SURF1 KO mice also exhibited elevated blood lactate levels, especially after exhaustive exercise.¹⁹ Thus, to evaluate whether gene therapy can correct the blood lactate level, we treated another group of mice with the same high (8×10^{11} vg/mouse) and low (2×10^{11} vg/mouse) dose of AAV9/hSURF1 through i.t. administration and examined blood lactate levels both at rest and after exhaustive exercise. The study scheme is shown in Figure 4A. The mice were tested at two ages, 10 weeks (6 weeks after treatment) and 10 months (9 months after treatment). Blood lactate was examined both before and after running on a treadmill

until exhaustion, and the change of blood lactate level was recorded as Δ Lactate. There were no differences in their running time (Figure 4B) or resting lactate level among groups at both ages (Figure 4C). However, as shown in Figure 4D, Δ Lactate of SURF1 KO mice was significantly higher than that of WT animals when tested at 10 months of age ($p < 0.001$). Both low-dose and high-dose treatments significantly reduced Δ Lactate of KO mice compared with vehicle-treated KO mice ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). Furthermore, we collected their tissues at 18 months of age and examined COX activity of cerebrum and liver. We obtained similar trends of improvement as found in previous analysis from the 8-week-old mice (Figures 4E and 4F). Taken together, our data suggest that both low and high doses of AAV9/hSURF1 treatment administered i.t. mitigated abnormal lactic acidosis during exhaustive exercise in SURF1 KO mice without affecting their gross physical function.

Intrathecal delivery of AAV9/hSURF1 is safe in WT mice

When considering the translation of this gene therapy strategy to patients, it is important to assess the long-term safety of the AAV9/hSURF1 vector. WT C57BL/6J mice were treated with the same regimen as in the efficacy study and they were monitored for gross

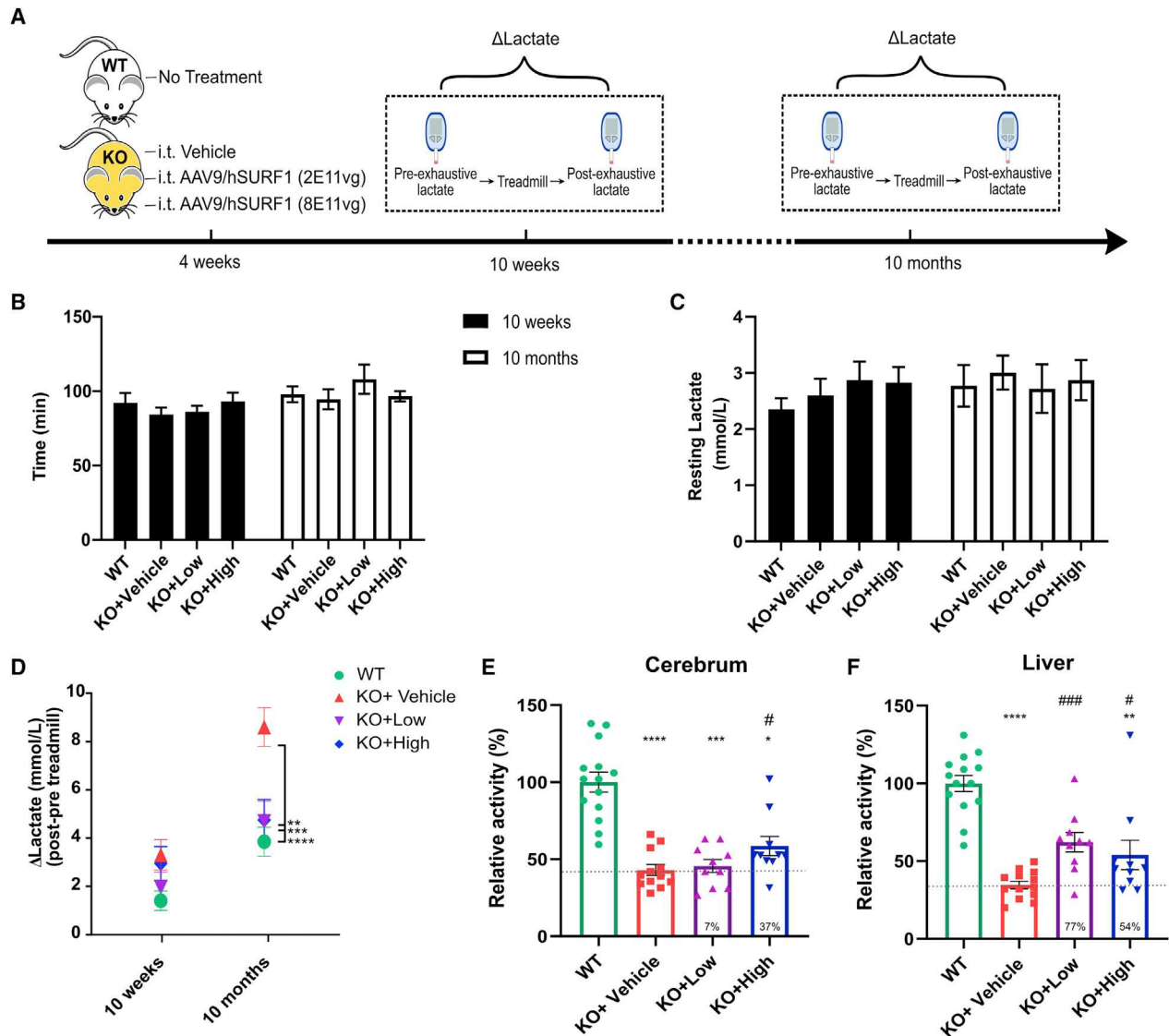


Figure 4. AAV9/hSURF1 normalized exhaustive exercise-induced lactic acidosis in SURF1 KO mice

(A) Scheme of study design. (B) Running time on treadmill until exhaustion. (C) Resting blood lactate level before treadmill running. (D) Change of lactate after running on treadmill until exhaustion. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with KO+Vehicle mice using a Tukey's multiple comparison test following two-way ANOVA. (E and F) COX activity of cerebrum (E) ($n = 8-10$ per group) and liver (F) ($n = 9-10$ per group) of mice at 18 months of age. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with WT mice using Dunn's multiple comparison method following a Kruskal-Wallis test, since KO+High mice did not pass the normality test using the Shapiro-Wilk's test. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared with KO+Vehicle mice using a one-tailed Student's t test. A dashed line in (E) and (F) indicates the level of KO+Vehicle, and the percentage of improvement compared with the KO+Vehicle group from each treatment is provided at the bottom of the respective column. Each data point represents measurement from an individual animal, with bars representing the mean \pm SEM.

changes, including body weight, survival, and general body conditions, for a year. The gene therapy treatment did not confer significant differences in body weight growth in either sex (Figures 5A and 5B). Body weight from each mouse at each time point is shown in Table S1. Serum from 4 weeks and 12 months post-dosing were analyzed for blood biochemistry, including total bilirubin (TBIL), blood urea nitrogen (BUN), albumin (ALB), creatine kinase (CK), and aspartate aminotransferase (AST). Levels of these biochemicals

indicate the function of kidney and liver. None of above showed significant changes induced by the treatment (Figures 5C-5G). No outward signs of body condition change were observed during the duration of the study. 12 months post-dosing, tissues from all 30 mice were collected and evaluated for histopathology abnormalities. We summarize all of the findings in Table S2, and none of the pathological signs was attributed to AAV9/hSURF1, but rather they were typical findings in aged mice. Thus, our study showed that doses up to

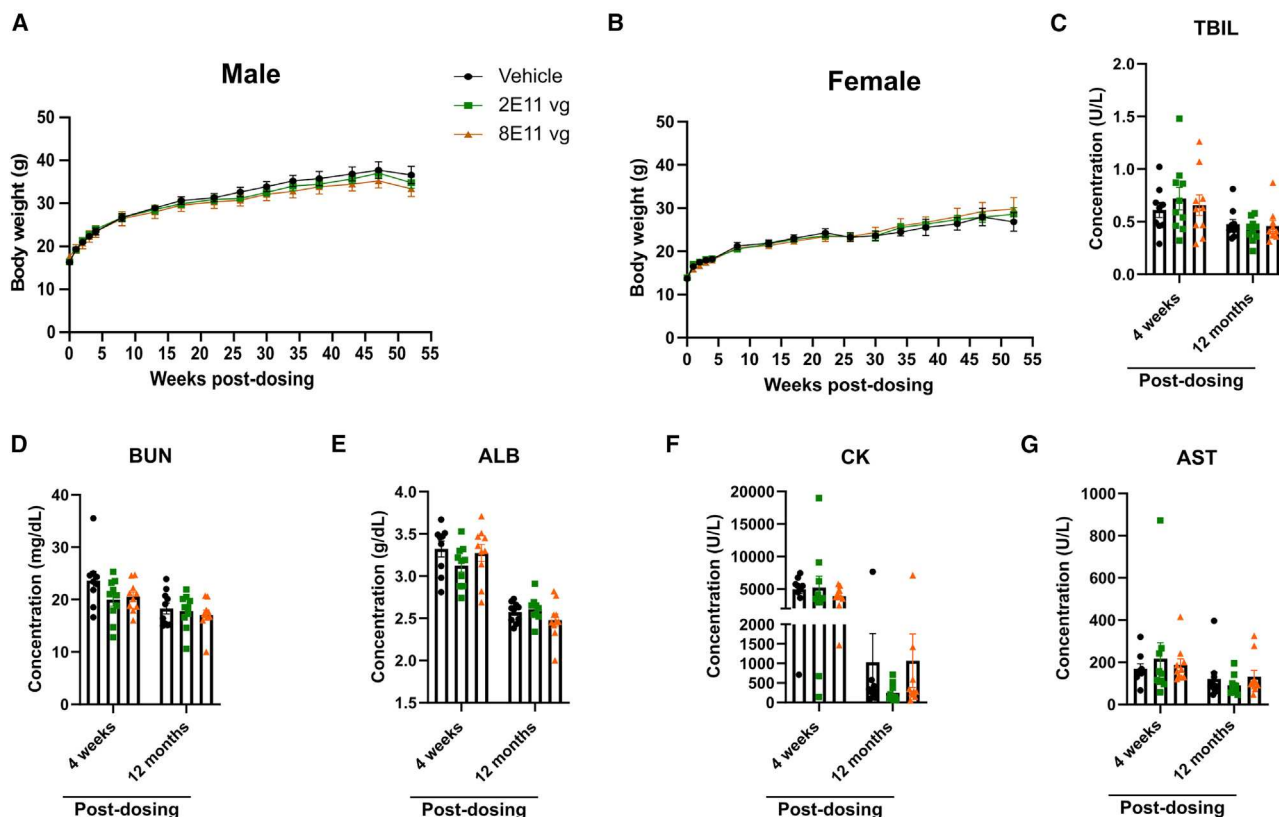


Figure 5. AAV9/hSURF1 is safe in WT C57BL/6J mice

(A and B) Body weight of male (A) and female (B) mice up to a year after dosing. (C–G) Blood chemistry tests 4 weeks and 12 months after dosing. Data are shown as mean \pm SEM.

8×10^{11} vg/mouse is safe for WT C57BL/6J mice for at least 12 months.

DISCUSSION

In this proof-of-concept study, we have designed and demonstrated AAV9/hSURF1 gene therapy as a translationally relevant option as a potential treatment for SURF1-related LS. On the basis of results obtained in the present mouse study, a one-time i.t. injection of AAV9/hSURF1 vectors, driven by the strong ubiquitous CBh promoter, has resulted in codon-optimized human SURF1 mRNA expression in multiple relevant brain and spinal cord regions. The treatment partially corrected COX activity deficiency, as well as abnormal lactate acidosis induced by exhaustive exercise in the SURF1 KO mice. These SURF1 KO mice and WT mice receiving the treatment did not show any signs of clinical or histological toxicity, supporting the general safety of AAV9/hSURF1. As a proof of concept, our results support the potential of this gene therapy strategy as a treatment for patients with SURF1-related LS.

A major limitation of this study is that we were not able to identify physiological phenotypes in the mouse model we used. In the past, there have been two SURF1 KO mouse models generated.^{7,18} The first

one is a constitutive KO model with exons 5–7 replaced by a neomycin (NEO) resistance cassette. Unfortunately, 90% of mice generated from this mouse line were embryonic lethal,⁷ but further studies suggested this might have been due the effects of the neomycin resistance gene cassette on the expression of neighboring genes.¹⁸ To resolve the issue, another mouse model was generated with a frame-shift mutation in exon 7 of the SURF1 gene and the neomycin cassette was removed,¹⁸ and this is the mouse model we used in our study. Surprisingly, these mice showed prolonged lifespan (longer than WT) and several other phenotypes indicating they do not fully recapitulate signs of human patients. We summarize the findings from published studies on this mouse model in Table 1. Based on these previous characterizations, we chose to test endurance capacity on a treadmill as the major phenotypic outcome measure. However, even with a large group of mice, we were not able to detect significant differences between WT and SURF1 KO mice regarding their running time or distance until exhaustion at either 10 weeks or 10 months of age. We have also tested the same mice on an accelerating rotarod, but consistent with some previous reports there was no significant difference between WT and SURF1 KO mice (Figure S3). Thus, due to the animal model limitations, we were constrained to using biochemical readouts as the major indicators of therapeutic efficacy.

Table 1. Phenotypes of *SURF1* KO mice identified in previous studies

Study no.	Mouse age	Sex	Behavioral/physiological test	Function tested	Change in <i>SURF1</i> KO mice	References
1	3 months	F+M	rotarod test	motor skill	↓	18
			Y-maze	working memory	↑	
2	6–7 months	M	object recognition	long-term memory	↑	27
			elevated maze	basal anxiety	↔	
			open field activity	basal activity	↔	
3	5–6 months	M	treadmill test	endurance capacity	↓↓	19
			grip strength	muscle strength	↓	
			grip strength	muscle strength	↔	
4	28 months	F	rotarod test	motor skill	↔	23
			sleep/wake pattern	basal activity	↔	
			open field activity	basal activity	↔	
5	3 months	F+M	treadmill test	endurance capacity	↔	20

F, female; M, male. ↓, decrease; ↑, increase; ↔, no differences; the number of arrows indicate the degree of changes.

SURF1 plays a critical role in assembling the COX holoenzyme. Thus, it is mechanistically sound to predict that the loss of *SURF1* will affect COX activity. *SURF1* patients generally have 20%–30% COX activity remaining.⁹ Our study and those of others show that the *SURF1* KO mice have about 40%–50% COX activity remaining.¹⁸ One might speculate that the difference of 20%–30% residual COX activity in humans compared to 40%–50% COX activity in the mice contributes to the profound difference in disease symptoms. The treatment exerted an approximately 20%–30% improvement in COX activity of brain and muscle over KO levels, with a higher degree of improvement in liver. We further confirmed the findings in the brain by using histological staining to examine the expression level of MT-CO1, which is commonly used as a marker for COX content level. The expression of MT-CO1 protein also showed similar trends of improvement in all disease-related brain areas, reinforcing and verifying the observed increases in COX activity. We also examined COX activity of the second cohort of mice at 18 months of age (17 months post-dosing), which showed a similar trend as the data we acquired from 8-week-old mice (4 weeks post-injection). These data suggest that improvements in COX activity from the treatment have been maintained for at least 17 months. As *SURF1* is a membrane-bound protein, it is expected to function in a cell-autonomous manner, meaning that the treatment can only exert cell-autonomous effects. Thus, this degree of improvement corresponds to our expectation of the number of cells transduced by AAV9 vectors (approximately 5%–20% across the brain).¹² While we did not test this directly, considering the expected percentage of cells transduced with the observed increase in COX activity, we speculate that the expressed *SURF1* transgene resulted in near-complete rescue of COX activity in any transduced cell. Due to limitations of the available animal models (i.e., a lack of behavioral phenotypes), we could not directly test whether AAV9/h*SURF1* treatment leads to behavioral improvements. Our future work involves using genetic or chemical approaches to further reduce COX activity to determine whether

more severe phenotypes can be generated in the mice, which we would predict could be rescued by AAV9/h*SURF1* gene therapy.

Besides COX activity, we also examined blood lactate levels in our mice. As previous studies have shown that blood lactate was lower in *SURF1* KO mice than in WT mice, we expected to see a similar difference in our mice. Thus, we measured their blood lactate level once every month for a year starting at 4 weeks of age, but there were no significant differences between WT and *SURF1* KO mice at any time point (data not shown). However, we observed lactic acidosis in *SURF1* KO mice induced by exhaustive exercise. After running on a treadmill until exhaustion, blood lactate of *SURF1* KO mice was elevated to a higher degree compared with that of WT mice, which was shown as the differences in the change of lactate levels. This difference was more significant when the mice were 10 months old (9 months post-dosing). The *SURF1* KO mice that have been treated with either the low or high dose of AAV9/h*SURF1* showed a change of lactate level close to that of WT, indicating that the treatment corrected this lactic acidosis. However, to identify which tissues are responsible for the rescue of lactic acidosis would require further studies.

Several features of this study shed light on the general context of a translatable AAV9-based gene therapy treatment for a mitochondrial disease with neurological manifestations. (1) In this study, we tested the effectiveness of administering AAV9 vectors through an i.t. route to mediate widespread CNS transduction. To our knowledge, this is the first time that this administration route has been tested for a mitochondrial disease. Many mitochondrial diseases have neurological manifestations.²⁸ Thus, for a gene therapy approach, it is important to choose a vector and an administration route that can specifically address those issues as a priority. Previous studies in both mice and NHPs have supported that an AAV9 vector carrying the reporter gene, green fluorescent protein (GFP), widely distributed the transgene broadly across the CNS following a single i.t. injection.^{12–15} Additionally, i.t. administration reduces the biodistribution of the vector to

peripheral organs compared to an i.v. route, but importantly some bio-distribution to peripheral organs still occurs, considering the multi-system involvement in mitochondrial diseases. (2) It is noteworthy that the treatment was administered to the mice at 4 weeks of age, an age approximately corresponding to a human teenager.²⁹ The onset of *SURF1*-related LS shows a broad range, but the most severe cases show an onset of around 2 years of age. Since LS is a degenerative disease, we would predict earlier intervention to correlate with a greater therapeutic benefit. Thus, patients might show a better outcome when they are diagnosed and treated early, even before the onset of symptoms. (3) The vector genome was a self-complementary design, which improved the transduction efficiency compared to a more traditional ssAAV genome design. (4) This study evaluated an AAV9 vector solution stock produced at a concentration of 1.6×10^{14} vg/mL, which is near the estimated concentration limit of AAV9 without risking AAV vector aggregation/precipitation. This concentrated vector preparation was injected undiluted (high dose, 8×10^{11} vg/mouse) and at a 1:4 dilution (low dose, 2×10^{11} vg/mouse). Since the volume of i.t. administration is limited, escalating to a higher dose is unlikely to be feasible. Further improvements to enhance efficacy might be facilitated by optimization of the intra-CSF AAV9 administration or utilizing a more efficient AAV capsid technology if it becomes available.

Taken together, our study demonstrated that the gene therapy strategy using AAV9/h*SURF1* partially but significantly corrected biochemical defects in a *SURF1*-related LS mouse model. There are no effective treatments for *SURF1*-related LS patients beyond supportive care, and we propose that this approach has the potential to improve or ameliorate disease symptoms for those patients. To achieve optimal therapeutic effects, we speculate that early treatment, high (approaching maximally feasible) doses of AAV9, and the use of a self-complementary genome design will be essential. Our studies supported these notions through examining biochemical outcome measures. Due to the limitations of the animal model, further studies may provide additional insights on the correlation between these biochemical improvements and patients' quality of life.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The *SURF1* KO mice were initially generated from Dr. Massimo Zeviani's Lab, and we acquired them as a gift from Dr. Holly Van Remmen's Lab at the Oklahoma Medical Research Foundation. The genotypes were determined by PCR analysis using a mouse ear punch as previously described.¹⁸ The WT C57BL/6J mice were supplied from the University of Texas Southwestern Medical Center (UTSW) Animal Breeding Core. The animal studies at UTSW were conducted according to a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). All mice were weaned between postnatal day (PND)21 and PND28 and were provided food and water *ad libitum*.

Plasmids

The complete name for h*SURF1*opt is self-complementary CBh codon-optimized human *SURF1*-BGHPA. It is composed of a CBh promoter, a codon-optimized human *SURF1* cDNA sequence

(ATUM, Newark, CA, USA), and a BGH poly(A) tail. This construct with a GFP reporter in place of h*SURF1*opt has been described in multiple publications from our group across different animal models.^{12,14,16,22,30} The 5' ITR was mutated to form the self-complementary structure as previously described.³¹

Virus production

Vectors were produced at the University of North Carolina-Chapel Hill Vector Core as described.³² Purified vectors were dialyzed in PBS (350 mM final NaCl concentration) containing 5% D-sorbitol and stored at -80°C until use. Thawed aliquots were subsequently stored at 4°C . A filter-sterilized solution of PBS (350 mM final NaCl concentration) containing 5% D-sorbitol was used as vehicle and virus dilution buffer. The viral vector was titered by qPCR and confirmed by PAGE and silver stain.³³ The vectors in this study were packaged in scAAV9. The certificate of analysis from the UNC Vector Core is provided in [Supplemental information](#).

Animal injections

AAV9 vectors were diluted in vehicle solution. For intrathecal injection, 5 μL was injected into each animal through lumbar puncture as previously described.³⁴ For i.v. injection, 20 μL was injected to each animal through the tail vein. The i.v. injection was performed 30–60 min before the following i.t. injection.

Cell culture and plasmid expression studies

HEK293 cells were cultured in a 100-mm cell culture dish for at least five passages before transfection. The culture medium contains DMEM (without L-glutamine), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% GlutaMAX, 1% non-essential amino acids, and 1% penicillin/streptomycin (Pen/Strep). The cells were grown in a humidified 5% CO_2 incubator at 37°C .

One day before transfection, HEK293 cells were plated into a six-well plate at a density of 0.6×10^6 cells/well. The next day, cells were transfected with 1, 1.5, or 2 μg of CBh-h*SURF1*opt plasmid, and 1.5 μg of CBh-EGFP plasmid as a control using PEIpro (Polyplus-transfection, New York, NY, USA). Cells were collected after 48 h. Protein was extracted using radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with $1 \times$ cComplete protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA). Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 30 μg of protein was loaded onto 10% SDS-PAGE gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were probed with *SURF1* antibody (1:500; GeneTex, Irvine, CA, USA) and β -actin antibody (1:10,000; Abcam, Cambridge, MA, USA) for 2 h at room temperature and then with goat anti-mouse (1:5,000; Invitrogen, Waltham, MA, USA; DyLight 800) or goat anti-mouse (1:5,000; Invitrogen, Waltham, MA, USA; DyLight 680). Immunofluorescence was imaged using a Bio-Rad imager.

Total mRNA was extracted using a PureLink RNA extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 500 ng of total

mRNA was converted to cDNA using SuperScript IV VILO master mix with ezDNase enzyme (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Oligonucleotide primers (Sigma, St. Louis, MO, USA) for PCR were as follows: FqPC_hsaSurf1, 5'-GTGGATCTGATCGGCATGGT-3'; RqPC_hsaSurf1, 5'-CGTCGATGAAAATCGGCTCG-3'. The PCR products were examined on 2% agarose gel with a 1-kb DNA ladder (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

COX activity assay

Mice were perfused with cold 1× PBS at 4 weeks post-treatment. Tissues were extracted quickly and immediately frozen on dry ice. All tissues were stored at −80°C until use. We used a complex IV/COX rodent enzyme activity microplate assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA) to examine the COX activity of our mice model, according to the manufacturer's instructions. Mitochondria were extracted as previously described.^{35,36} After mitochondria extraction, COX is immunocaptured within the wells and activity is determined colorimetrically through the oxidation of reduced cytochrome *c* as an absorbance decrease at 550 nm. The absorbance of each sample was measured once every minute for 120 min, and the initial rate of decrease was calculated as COX activity. For COX activity of 8-week-old mice, assays were performed in multiple batches, in which at least one WT and one KO+Vehicle mouse were included. Each data point was then normalized to the average of all WT COX activity as relative COX activity. For COX activity of 18-month-old mice, assays were performed in three batches for each tissue. We noticed that there were significant differences among the raw values of WT COX activity of the three batches. Thus, each data point was normalized to the average of WT COX activity within each batch as relative COX activity.

Exhaustive exercise on treadmill and blood lactate test

Blood lactate following exhaustive exercise was measured by the UTSW Metabolic Phenotyping Core. All mice were familiarized to the treadmills for 2 days prior to the exercise session. On day 1, they experienced a 5-min rest on the treadmill followed by running for 5 min at the speed of 8 m/min and then for 5 min at the speed of 10 m/min. On day 2, they experienced a 5-min rest on the treadmill followed by running for 5 min at the speed of 10 m/min and then for 5 min at the speed of 12 m/min.

On day 3 (5 weeks post-dosing), mice were placed on the treadmill for 5 min at rest, followed by running with a starting speed of 10 m/min for 40 min, next by running at speeds that were increased at the rate of 1 m/min every 10 min until the speed reached 13 m/min, and finally by running at speeds that were increased at the rate of 1 m/min every 5 min until exhaustion. The exhaustion time was noted as the time at which the mice remained on the electric shock grid for 5 continuous seconds, without attempting to resume running. Blood lactate was taken before putting the mice onto the treadmill and immediately when the mice came off the treadmill. A drop of blood was collected from the tail vein, and blood lactate concentration was measured using a Lactate Plus lactate meter (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA).

SURF1 RNAscope and MT-CO1 immunohistochemistry (IHC)

SURF1 mRNA and MT-CO1 protein levels were visualized in the brain and spinal cord for a set of treated animals. The following protocol was carried out by an individual blinded to the treatments and genotypes of all animals. Tissues ready for staining were processed and embedded in paraffin and cut into 5-μm sections on slides. Both staining (RNAscope and MT-CO1 IHC) were performed on the same slide. An RNAscope 2.5 HD assay kit (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) was used. Slides were deparaffinized by xylene and then xylene was removed with 200 proof ethanol. Then slides were incubated with hydrogen peroxide for 10 min at room temperature and washed with distilled water. Antigen retrieval was performed by boiling the slides in 1× target retrieval solution for 10 min, washing with distilled water, dehydrating with 200 proof ethanol, and then air-drying. Protease Plus was added to each section, incubated at 40°C for 30 min, and washed with distilled water. Then slides were incubated with an h*SURF1*opt RNAscope probe in a HybEZ oven at 40°C for 2 h and washed with 1× wash buffer. Then slides were incubated with AMP1–6 for 30 or 15 min following the RNAscope 2.5 HD detection kit protocol. Finally, slides were incubated with RED solution for 10 min to detect the RNAscope signals.

After finishing the RNAscope processing, slides were washed with 1× PBS twice for 5 min each, then blocked with 5% goat normal serum (GNS) for 1 h at room temperature. Then slides were incubated with anti-MT-CO1, mouse (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab14705), diluted 1:400 in GNS at 4°C overnight. Then slides were washed with tap water and 1× PBS and incubated with biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) secondary antibody (Vector Labs, BA-9200) at 1:400 for 1 h at room temperature. Slides were washed and incubated with ABC (Vector Labs, PK-6100) for 30 min at room temperature and washed with tap water and 1× PBS. Diaminobenzidine (DAB) (D4293, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to develop the reaction product. Finally, slides were counterstained with modified Mayer's hematoxylin and covered with coverslips. Slides were imaged with an Aperio ImageScope.

Image analysis

Histology images were analyzed using custom analysis settings in the HALO image analysis platform (HALO2.2, Indica Labs, Albuquerque, NM, USA). A region of interest (ROI) was hand drawn on each image to allow for analysis by tissue region. Within the brain, four major regions were drawn: (1) thalamus, hypothalamus, and midbrain (THM); (2) pons and medulla (PM); (3) striatum; (4) cerebellum. For spinal cord samples, we analyzed lumbar cord (injection site) and cervical cord (farthest from injection site). A threshold for each stain was set using positive and negative control images, and the same analysis settings were applied for every image of the same stain. The percent area strongly staining for each marker of interest was recorded for each tissue/ ROI.

Blood biochemistry tests for WT mice

Blood was collected from submandibular veins of each mouse 4 weeks after dosing into 1.5-mL tubes. Blood was allowed to clot at room

temperature for 2 h. The clotted material was removed by centrifugation at 5,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant (serum) was transferred to a new tube and frozen immediately at –80°C until the test. The tests were conducted by the UTSW Metabolic Phenotyping Core.

Statistical analysis

Underlying assumptions checking for the continuous variables was performed prior to analysis. Specifically, we used the Shapiro-Wilk's test for the normality of the data distribution and the Brown-Forsythe test for homogeneity of variance. Univariable comparisons were conducted using a Student's t test or one-way ANOVA for normally distributed data with equal variance, and Wilcoxon or Kruskal-Wallis test, as a non-parametric counterpart, for non-normal data. Statistical significance was assumed at the 0.05 level, and multiple comparisons were adjusted using Tukey's multiple comparison test for the Kruskal-Wallis test, or a Dunn's multiple comparison test for the one-way ANOVA. For COX activity data for mice of both 8 weeks and 18 months of age, each group of AAV9-treated KO mice were compared with vehicle-treated KO mice using a one-tailed t test, as we would not expect COX activity to be reduced following treatment. A two-tailed t test was performed to evaluate associations between MT-CO1 protein expression and COX activity. Blood lactate data were analyzed with a two-way ANOVA with adjustment of multiple comparisons using Tukey's multiple comparison test. GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used for all statistical analyses and generating the graphs.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.09.001>.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by funding from the Cure SURF1 Foundation (now the Cure Mito Foundation) and Taysha Gene Therapies to S.J.G. We thank Dr. Massimo Zeviani and Dr. Holly Van Remmen for providing the initial SURF1 KO mice breeders, and the UNC Vector Core for producing the vectors used in these studies. We thank the UT Southwestern Metabolic Phenotyping Core for performing endurance capacity tests, measuring blood lactate, and conducting blood chemistry tests. We also thank Debby Szczepanski from the UTSW Animal Resource Center for performing intravenous injections for us. We acknowledge Dr. Mary Wright-Carter and her team at the UTSW Diagnostic Laboratory for conducting the toxicology evaluation on tissues from the safety study and providing the histopathological safety report.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Q.L. and S.J.G. contributed to the study concept and design. Q.L., M.R., and Y.H. contributed to data acquisition. Q.L. and M.L. contributed to data analysis. Q.L., M.L., and S.J.G. contributed to drafting the text and figures.

DECLARATION OF INTERESTS

Q.L. and S.J.G. are inventors of the vectors used in this study, and the vectors are licensed to Taysha Gene Therapies. Q.L. and S.J.G. may receive inventor income from Taysha Gene Therapies. S.J.G. has received inventor income from Asklepios Biopharma, but that intellectual property was not used in this study. The remaining authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Rossi, A., Biancheri, R., Bruno, C., Di Rocco, M., Calvi, A., Pessagno, A., and Tortori-Donati, P. (2003). Leigh syndrome with COX deficiency and *SURF1* gene mutations: MR imaging findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* *24*, 1188–1191.
- Lake, N.J., Compton, A.G., Rahman, S., and Thorburn, D.R. (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann. Neurol.* *79*, 190–203.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., Macmillan, C., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Wang, J., Chevrette, M., et al. (1998). *SURF1*, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* *20*, 337–343.
- Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carrozzo, R., Galimberti, C., Munaro, M., Granatiero, M., Zelante, L., Gasparini, P., Marzella, R., Rocchi, M., et al. (1998). Mutations of *SURF1* in Leigh disease associated with cytochrome *c* oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 1609–1621.
- Bundschuh, F.A., Hannappel, A., Anderka, O., and Ludwig, B. (2009). *Surf1*, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis. *J. Biol. Chem.* *284*, 25735–25741.
- Hannappel, A., Bundschuh, F.A., and Ludwig, B. (2012). Role of *Surf1* in heme recruitment for bacterial COX biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1817*, 928–937.
- Agostino, A., Invernizzi, F., Tiveron, C., Fagiolaro, G., Prella, A., Lamantea, E., Giavazzi, A., Battaglia, G., Tatangelo, L., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2003). Constitutive knockout of *Surf1* is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome *c* oxidase deficiency in mice. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 399–413.
- Poyau, A., Buchet, K., Bouzidi, M.F., Zabot, M.T., Echenne, B., Yao, J., Shoubridge, E.A., and Godinot, C. (2000). Missense mutations in *SURF1* associated with deficient cytochrome *c* oxidase assembly in Leigh syndrome patients. *Hum. Genet.* *106*, 194–205.
- Wedatilake, Y., Brown, R.M., McFarland, R., Yapli-lee, J., Morris, A.A.M., Champion, M., Jardine, P.E., Clarke, A., Thorburn, D.R., Taylor, R.W., et al. (2013). *SURF1* deficiency: A multi-centre natural history study. *Orphanet J. Rare Dis.* *8*, 96.
- Ghosh, S., Brown, A.M., Jenkins, C., and Campbell, K. (2020). Viral vector systems for gene therapy: A comprehensive literature review of progress and biosafety challenges. *Appl. Biosaf.* *25*, 7–18.
- Deverman, B.E., Ravina, B.M., Bankiewicz, K.S., Paul, S.M., and Sah, D.W.Y. (2018). Gene therapy for neurological disorders: Progress and prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* *17*, 641–659.
- Bailey, R.M., Rozenberg, A., and Gray, S.J. (2020). Comparison of high-dose intracranial magna and lumbar puncture intrathecal delivery of AAV9 in mice to treat neuropathies. *Brain Res.* *1739*, 146832.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubrel, L., Douar, A.-M.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.-A.A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther.* *17*, 1187–1196.
- Gray, S.J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., Ojeda, S.R., and Samulski, R.J. (2011). Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther.* *19*, 1058–1069.
- Snyder, B.R., Gray, S.J., Quach, E.T., Huang, J.W., Leung, C.H., Samulski, R.J., Boulis, N.M., and Federici, T. (2011). Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery. *Hum. Gene Ther.* *22*, 1129–1135.

16. Gray, S.J., Nagabhushan Kalburgi, S., McCown, T.J., and Jude Samulski, R. (2013). Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Ther.* 20, 450–459.
17. Bailey, R.M., Armao, D., Nagabhushan Kalburgi, S., and Gray, S.J. (2018). Development of intrathecal AAV9 gene therapy for giant axonal neuropathy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 9, 160–171.
18. Dell'agnello, C., Leo, S., Agostino, A., Szabadkai, G., Tiveron, C., Zulian, A., Prella, A., Roubertoux, P., Rizzuto, R., and Zeviani, M. (2007). Increased longevity and refractoriness to Ca^{2+} -dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 16, 431–444.
19. Pulliam, D.A., Deepa, S.S., Liu, Y., Hill, S., Lin, A.-L., Bhattacharya, A., Shi, Y., Sloane, L., Viscomi, C., Zeviani, M., and Van Remmen, H. (2014). Complex IV-deficient *Surf1*^{-/-} mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem. J.* 462, 359–371.
20. Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagioli, G., Schon, E.A., Lamperti, C., and Zeviani, M. (2011). In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metab.* 14, 80–90.
21. McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* 10, 2112–2118.
22. 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.
23. Deepa, S.S., Pharaoh, G., Kinter, M., Diaz, V., Fok, W.C., Riddle, K., Pulliam, D., Hill, S., Fischer, K.E., Soto, V., et al. (2018). Lifelong reduction in complex IV induces tissue-specific metabolic effects but does not reduce lifespan or healthspan in mice. *Aging Cell* 17, e12769.
24. Meo, I.D., Marchet, S., Lamperti, C., Zeviani, M., and Viscomi, C. (2017). AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Ther.* 24, 661–667.
25. Kovářová, N., Pecina, P., Nůšková, H., Vrbacký, M., Zeviani, M., Mráček, T., Viscomi, C., and Houštěk, J. (2016). Tissue- and species-specific differences in cytochrome c oxidase assembly induced by SURF1 defects. *Biochim. Biophys.* 1862, 705–715.
26. Hallmann, K., Kudin, A.P., Zsurka, G., Kornblum, C., Reimann, J., Stüve, B., Waltz, S., Hattungen, E., Thiele, H., Nürnberg, P., et al. (2016). Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy. *Brain* 139, 338–345.
27. Lin, A.-L., Pulliam, D.A., Deepa, S.S., Halloran, J.J., Hussong, S.A., Burbank, R.R., Bresnen, A., Liu, Y., Podlutska, N., Soundararajan, A., et al. (2013). Decreased in vitro mitochondrial function is associated with enhanced brain metabolism, blood flow, and memory in Surf1-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1605–1611.
28. Russell, O.M., Gorman, G.S., Lightowers, R.N., and Turnbull, D.M. (2020). Mitochondrial diseases: Hope for the future. *Cell* 181, 168–188.
29. Fox, J.G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., and Smith, A. (2006). *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models* (Elsevier).
30. Federici, T., Taub, J.S., Baum, G.R., Gray, S.J., Grieger, J.C., Matthews, K.A., Handy, C.R., Passini, M.A., Samulski, R.J., and Boulis, N.M. (2012). Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther.* 19, 852–859.
31. McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8, 1248–1254.
32. Clément, N., and Grieger, J.C. (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 16002.
33. Gray, S.J., Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A., McCown, T.J., and Samulski, R.J. (2011). Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in vitro and in vivo administration. *Curr. Protoc. Neurosci.* 57, 4.17.11–4.17.30.
34. Gray, S.J., Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A., McCown, T.J., and Samulski, R.J. (2011). Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in vitro and in vivo administration. *Curr. Protoc. Neurosci.* 57, 4.17.11–4.17.30.
35. Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: Functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2, 287–295.
36. Sims, N.R., and Anderson, M.F. (2008). Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat. Protoc.* 3, 1228–1239.