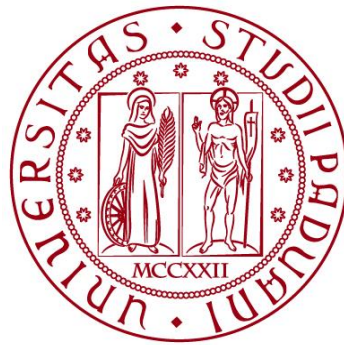


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Correlazione tra l'età di insorgenza dell'ataxia
di Friedreich e la posizione delle interruzioni
nella sequenza ripetuta GAA nel gene FXN**

Tutor: Prof.ssa Paola Costantini

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Rania ben Mokhtar Heddaji

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Sommario

Abstract	3
1.Introduzione	4
1.1 Evoluzione storica delle conoscenze su questa patologia	5
1.2 Il ruolo della proteina fratassina.....	5
1.3 Approcci terapeutici	6
1.3.1. Aumento dell'espressione genica della fratassina	6
1.3.2 Sostituzione del gene <i>FXN</i>	7
1.3.3 Aumento dei meccanismi antiossidanti	7
1.4 Scopo dello studio in analisi	7
2. Approccio sperimentale	8
2.1 TP PCR.....	9
3. Risultati e discussione	9
3.1 Output dell'elettroforesi capillare: l'elettroferogramma	9
3.2 Sottogruppi	11
3.3 Correlazione tra l'età di insorgenza effettiva e quella predetta	13
Conclusione	15
Bibliografia.....	16

Abstract

L'ataxia di Friedreich è una malattia genetica rara autosomica recessiva causata da una sequenza ripetuta GAA nel primo introne del gene *FXN*. Il risultato di tale alterazione genetica è un deficit nella produzione della proteina codificata dal gene, la fratassina. Tramite il sequenziamento del gene in soggetti affetti si è evidenziato che possono esserci interruzioni del tratto ripetuto e che queste possono essere correlate all'età di insorgenza della patologia. Tramite TP PCR si sono analizzate le interruzioni presenti nel tratto ripetuto del gene e si è osservato che le interruzioni di pochi nucleotidi sono le più frequenti. Si è inoltre effettuato un raggruppamento delle alterazioni in base alla posizione e alla lunghezza e si è correlato con l'età di insorgenza della malattia. Da questo studio si è evinto che le interruzioni situate in 3' del tratto ripetuto GAA sono quelle associate ad un'insorgenza più tardiva della malattia e questa informazione può essere alla base di altre ricerche per garantire una diagnosi e un trattamento ottimale della malattia.

1.Introduzione

L'atassia di Friedreich è una malattia genetica rara autosomica recessiva la cui caratteristica principale è la mancanza di coordinazione del movimento, da cui atassia. Essa è provocata dall'espansione in omozigosi di un tratto trinucleotidico GAA ripetuto nell'introne 1 del gene *FXN*, gene codificante la proteina mitocondriale fratassina. Tale espansione provoca delle modificazioni a livello della cromatina che causano l'inibizione della trascrizione del gene e inoltre, nel momento in cui il gene viene trascritto ad RNA, esso può formare un R-loop con il tratto genomico corrispondente che va ad inibire la traduzione. I tessuti maggiormente colpiti sono quelli che esprimono più mRNA di tale proteina, ovvero quelli ad alto consumo energetico come il fegato, i reni, il sistema nervoso e il cuore.

I sintomi principali di questa patologia sono la perdita di coordinazione ed equilibrio, disartria (disordini del linguaggio dovuti ad un mancato controllo dei muscoli che ne permettono la sua articolazione), debolezza e perdita di capacità sensoriale. A questi problemi neurologici si aggiungono altre problematiche non neurologiche come l'aumento dello spessore del ventricolo sinistro (cardiomiopatia ipertrofica), diabete mellito e alterazioni strutturali del piede e/o della colonna vertebrale (cifoscoliosi).

Come già anticipato, la maggior parte dei pazienti affetti da atassia di Friedreich (98%) presenta un'espansione trinucleotidica nell'introne 1 di *FXN*, mentre la restante minoranza (2%) presenta mutazioni puntiformi nel gene in questione in un allele e l'espansione della tripletta nell'altro.

Durante il percorso di diagnosi, esami come la RM o l'elettroencefalografia sono utili perché si possono osservare le condizioni strutturali di cervello, cervelletto e del midollo spinale o si può valutare la velocità di conduzione nervosa.

È possibile una diagnosi prenatale della patologia mediante prelievo di villi coriali o del liquido amniotico.

La prevalenza dell'atassia di Friedreich è stimata essere di 1:20 000 in Europa, infatti è considerata una delle atassie ereditarie più comuni.

La prevalenza è nettamente minore nella parte orientale del globo, dove è stimata essere 1:250 000.

1.1 Evoluzione storica delle conoscenze su questa patologia

Viene scoperta nel 1863 dal patologo Nikolaus Friedreich che inizialmente non ne colse la natura ereditaria, fino al 1876 quando, sempre grazie ad alcuni suoi studi di pedigree riuscì ad individuare l'aspetto dell'ereditarietà di questa patologia.

L'aspetto genetico della malattia viene sviscerato soltanto nel 1996 quando il gruppo di ricerca di Campuzano scopre che un gruppo di pazienti affetti da questa patologia hanno delle mutazioni puntiformi nella regione 13 del braccio lungo del cromosoma 9 e che la maggior parte dei pazienti affetti analizzati hanno un'espansione trinucleotidica in omozigosi nel primo introne del gene identificato, ovvero un gene che codifica per la proteina frataxina.[1]

Successivamente, un altro studio (1997) ha permesso di identificare la localizzazione mitocondriale e la funzione della proteina frataxina grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali, ipotizzando che la riduzione dei livelli di frataxina nei pazienti affetti da atassia di Friedreich possa causare danni ossidativi nella cellula. [2]

Studi recenti hanno fornito diversi risultati e considerazioni riguardanti gli aspetti genetici della patologia. In uno studio del 2018 ad esempio, si è visto che utilizzando la tecnica TP PCR la maggior parte dei pazienti affetti da atassia di Friedreich hanno un tratto ripetuto "puro", ovvero senza interruzioni; sequenziando il tratto in questione invece si potevano osservare delle piccole interruzioni del tratto GAA ripetuto in 3'. Sempre in questo studio si è cercato di capire in quale posizione del tratto ripetuto le interruzioni erano più frequenti e si è notato che erano prevalentemente attorno al 3'. [3]

Un'altra informazione molto importante precedentemente ricavata da diversi studi è che maggiore è la lunghezza del tratto ripetuto prima insorge la malattia nei pazienti.

1.2 Il ruolo della proteina frataxina

La proteina frataxina è estremamente conservata tra le specie, a partire dai procarioti fino ai mammiferi. Essa è coinvolta in numerosi processi essenziali per la vitalità cellulare. In particolare, tra le funzioni della frataxina sono state ipotizzate l'omeostasi e il deposito del ferro, il metabolismo del gruppo eme, la maturazione delle proteine Fe-S, la via di trasduzione del segnale del monossido

di azoto, la protezione dal danno ossidativo tramite controllo dei centri redox e delle specie radicaliche dell'ossigeno e la respirazione. Non si conoscono bene i meccanismi specifici con cui questa proteina svolga la sua funzione biologica però molti studi si occupano di capirne la complessità d'azione.

Strutturalmente essa è formata da foglietti beta racchiusi da due alfa eliche a formare un "sandwich" e analizzando la struttura si può individuare una regione carica negativamente molto conservata tra le specie che fa ipotizzare l'essenzialità della stessa nella funzione della proteina.

1.3 Approcci terapeutici

Al giorno d'oggi ancora non esiste una cura definitiva all'ataxia di Friedreich vista la complessità eziologica e sintomatica, però esistono delle terapie farmacologiche in grado di alleviare i sintomi e sono in corso diversi progetti di ricerca il cui scopo è sviluppare un trattamento efficace per migliorare la qualità della vita dei pazienti affetti da ataxia di Friedreich.

Come abbiamo già precedentemente illustrato, la proteina frataxina è coinvolta nella sintesi dei centri Fe-S nel mitocondrio; tale gruppo prostetico è presente in molte molecole biologicamente rilevanti e dunque una sua inefficiente produzione si manifesta in diverse patologie dell'organismo.

Diversi approcci terapeutici sono stati individuati per trattare l'ataxia di Friedreich.

1.3.1. Aumento dell'espressione genica della frataxina

Diverse sono le tecniche in grado di ridurre il blocco trascrizionale dovuto al tratto GAA ripetuto. In primo luogo abbiamo il genome editing, che permette di rimuovere interamente il tratto ripetuto. Una seconda opzione è l'impiego di fattori di allungamento sintetici (Syn-TEFs o synthetic transcription elongation factors) capaci di legare il tratto GAA ripetuto e facilitare la traduzione per aumentare il livello di espressione della proteina frataxina.

Anche l'impiego di oligonucleotidi antisense può essere un'ottima soluzione: si è visto che introducendo delle sequenze nucleotidiche complementari al tratto GAA si ottengono livelli superiori di frataxina e questo è dovuto al fatto che la

sequenza antisense va ad impedire la formazione del R-loop tra il tratto del DNA e la sequenza RNA trascritta e dunque l'inibizione della trascrizione.

1.3.2 Sostituzione del gene *FXN*

Sono in corso diversi *trials* clinici per altre malattie neurodegenerative di terapia genica con adenovirus usati come sistema di *delivery* del gene *FXN* e questo sicuramente apre molte possibilità anche ai pazienti affetti da atassia di Friedreich. Oltre ad adenovirus, sono in corso *trials* preclinici che utilizzano le LNPs (lipid nanoparticles) per far arrivare degli mRNA funzionali alle cellule malate.

1.3.3 Aumento dei meccanismi antiossidanti

Le cellule dei pazienti affetti da atassia di Friedreich, essendo carenti di fratassina, sono caratterizzate da una ridotta capacità antiossidante ed essa è ipotizzata essere a sua volta legata ad una ridotta espressione di un fattore di trascrizione, NRF2 (fattore di trascrizione nucleare eritroide), che regola l'espressione dell'elemento di risposta antiossidante (ARE). I livelli di questo fattore di trascrizione sono fisiologicamente mantenuti stabili dal sistema di proteolisi ubiquitina-dipendente. Omaveloxolone è un farmaco in grado di inibire l'ubiquitinazione di questo fattore. Questo farmaco sta ultimando la fase 2 di *trial* clinico.

Un altro meccanismo che contrasta lo stress ossidativo è l'incorporazione di acidi grassi polinsaturi deuterati (dPUFAs) nelle membrane mitocondriali. Le cellule che presentano bassi livelli di fratassina infatti, hanno un metabolismo del Fe danneggiato che può portare alla presenza di ferro libero all'interno del mitocondrio. Questi acidi grassi polinsaturi deuterati non subiscono perossidazione e potrebbero mitigare i danni che il ferro libero causa alle membrane. Anche questa terapia è già in fase 2 di *trial* clinico.

1.4 Scopo dello studio in analisi

Nello studio analizzato in questo elaborato viene selezionata una coorte di 101 pazienti e vengono raccolti i dati riguardanti la posizione delle interruzioni del tratto ripetuto, la lunghezza del tratto stesso e l'età di insorgenza della malattia.

Questa coorte viene utilizzata per formulare un modello matematico che vada a correlare la posizione e il numero di interruzioni con l'età di insorgenza della malattia. L'obiettivo è cercare di capire come la lunghezza del tratto ripetuto possa dare delle informazioni essenziali come l'età d'esordio, molto importante per l'approccio terapeutico. L'età d'insorgenza della malattia infatti è un elemento molto importante dal punto di vista della terapia farmacologica ma anche da un punto di vista di ricerca per una cura definitiva ed è per questo che è il principale protagonista di questo studio.

2. Approccio sperimentale

Nelle patologie con un tratto trinucleotidico ripetuto come l'ataxia di Friedreich o come la sindrome dell'X-fragile (dove la ripetizione riguarda il trinucleotide CGG) è impossibile determinare la lunghezza del tratto ripetuto utilizzando la tecnica di PCR classica per via della lunghezza del tratto ripetuto che va ad alterare il prodotto di amplificazione. Questo ha fatto sì che per molti anni l'unica tecnica in grado di determinare la lunghezza del tratto ripetuto fosse il Southern Blotting. Lo sviluppo della tecnica Triplet-Primed PCR (TP PCR) ha permesso di evolvere i metodi diagnostici. Questa tecnica è stata sviluppata nel 1996 da John P. Warner e colleghi per rilevare l'espansione trinucleotidica CAG. Questa tecnica ed è adattabile per diverse patologie che hanno come base l'espansione nucleotidica.

In questo studio, per analizzare il gene è stato ottenuto del sangue periferico dai pazienti selezionati che è stato sottoposto ad estrazione del DNA, successivamente è stata utilizzata la tecnica TP PCR per amplificare le sequenze d'interesse. I campioni sono stati analizzati con elettroforesi capillare e i risultati visualizzati come elettroferogrammi grazie ad uno specifico software (GeneMapper).

Per quanto riguarda la parte di analisi dei dati sono stati usati strumenti matematici e statistici quali il test di Kruskal-Wallis, il metodo dei minimi quadrati e anche il modello esponenziale. In particolare è stato sfruttata la regressione lineare ai minimi quadrati utilizzando un software matematico (MATLAB) e il test di Kruskal-Wallis grazie a GraphPad Software.

2.1 TP PCR

In questa tecnica vengono utilizzati 3 primer. Il primo primer (forward) è marcato con un fluoroforo e si appaia alla regione che fiancheggia il tratto ripetuto; il secondo primer (forward) si appaia al tratto ripetuto ed è un primer lungo 7 trinucleotidi; il terzo primer (reverse) si appaia anch'esso alla regione fiancheggiante il tratto ripetuto ma all'estremità 3'. Durante la reazione TP PCR il primer che appaia il tratto ripetuto si lega in diversi punti del tratto e così si ottengono prodotti di amplificazione di varia lunghezza. L'output è visualizzato in un elettroferogramma, generato grazie al software GeneMapper che estrapola i dati dall'elettroforesi capillare e mette in ordine i vari frammenti in ordine di lunghezza.

3. Risultati e discussione

I risultati ottenuti tramite analisi dei campioni vengono prima analizzati e poi utilizzati per creare un modello matematico di predizione dell'insorgenza della malattia. In questo studio si vuole evidenziare l'importanza delle interruzioni e della loro considerazione come criterio di classificazione.

3.1 Output dell'elettroforesi capillare: l'elettroferogramma

I risultati del TP PCR sono stati visualizzati grazie ad elettroferogramma, che permette di individuare facilmente le interruzioni perché vengono visualizzate come un abbassamento del segnale. Sull'asse delle ascisse vengono rappresentate le varie lunghezze dei frammenti rilevati dall'elettroforesi capillare mentre nell'asse delle ordinate sono indicate le unità di relativa fluorescenza (RFU) dei frammenti. I prodotti dell'amplificazione sono infatti rilevabili con un'alta sensibilità grazie ai fluorofori dei primer; maggiore è il segnale fluorescente e maggiore è il numero di frammenti di quella lunghezza. Nella figura 1 sono riportati 4 elettroferogrammi di 3 pazienti. I risultati rappresentati nei grafici A e C appartengono allo stesso paziente che presenta in entrambi i locus cromosomici due tratti ripetuti privi di interruzioni. Possiamo invece individuare la presenza di un'interruzione del tratto ripetuto nella sequenza analizzata sia nel grafico B che nel grafico D.

In particolare nel grafico B possiamo dedurre che si tratta di un'interruzione nell'estremità 3' perché il grafico è ottenuto da una visualizzazione del Forward TP PCR, mentre nel grafico D osserviamo un'interruzione in 5' perché il grafico si riferisce ad una Reverse TP PCR.

Osserviamo anche come il grafico B relativo al paziente con le interruzioni all'estremità 3' indichi un numero minore di frammenti rispetto al paziente del grafico D, che ha invece interruzioni all'estremità 5'.

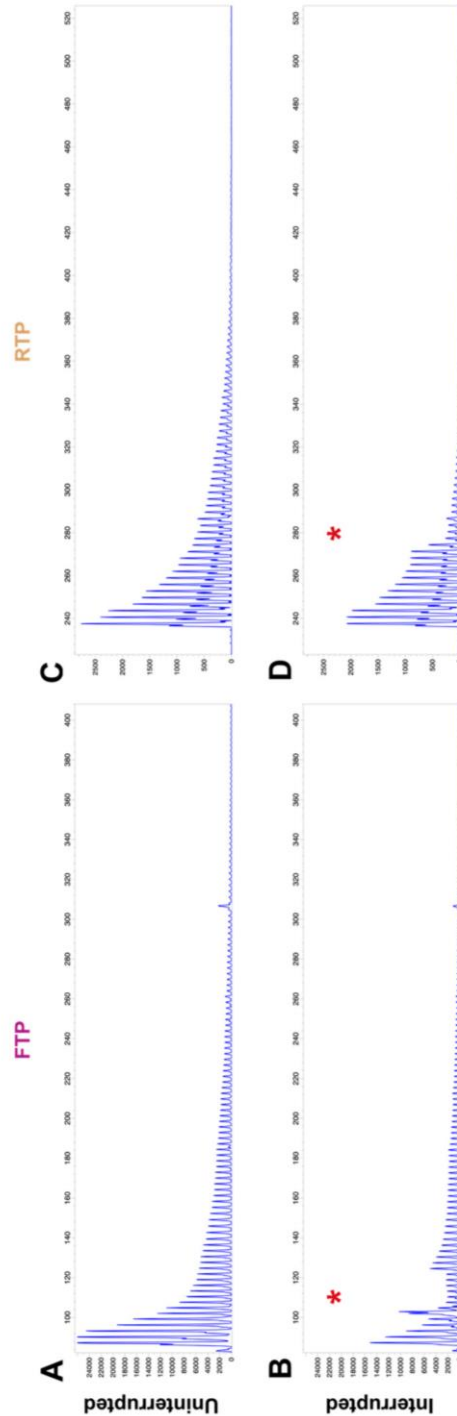


Figura 1. Risultati TP PCR visualizzati su elettroferogramma

- A. Elettroferogramma forward senza interruzioni
- B. Elettroferogramma forward mostra interruzione all'estremità 3'
- C. Elettroferogramma reverse senza interruzioni (stesso individuo di A)
- D. Elettroferogramma reverse mostra interruzione all'estremità 5'

Questa visualizzazione ha permesso di creare facilmente dei gruppi relativi alle posizioni delle interruzioni, che saranno molto importanti per schematizzare il risultato. Da quest'analisi si è potuto osservare che il 71.3% dei pazienti aveva interruzioni nel tratto ripetuto e che il 44.4% di essi la hanno all'estremità 3'. Seguono i pazienti con interruzioni ad entrambe le estremità (29.2%) e poi i pazienti con interruzioni solo al 5' (26.4%).

3.2 Sottogruppi

I pazienti sono stati divisi in categorie in base al tipo di interruzione presente nel tratto ripetuto, e poi vengono correlati con due parametri molto importanti: la lunghezza del tratto ripetuto e l'età di insorgenza della malattia.

I diagrammi a scatola sono stati ottenuti con i dati dei pazienti e sfruttando i sottogruppi con le posizioni delle interruzioni. (Figura 2)

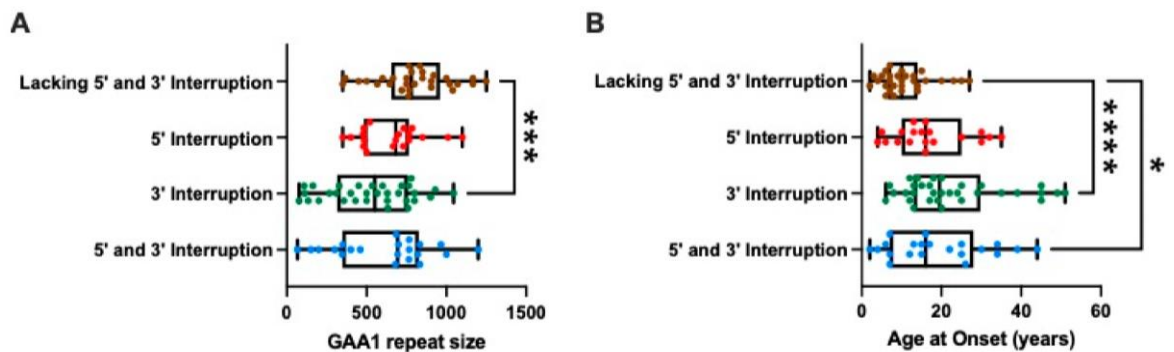


Figura 2. Lunghezza tratto ripetuto ed età d'insorgenza nei diversi sottogruppi

- A. I pazienti con interruzioni all'estremità 3' hanno mediamente un tratto ripetuto più corto
- B. Nei pazienti con interruzioni all'estremità 3' i primi sintomi della malattia si presentano mediamente più tardi

Si può osservare che il gruppo di pazienti con l'interruzione all'estremità 3' hanno una media di ripetizioni del tratto GAA inferiore agli altri sottogruppi (pannello A) e inoltre sono anche il gruppo che ha in media un'età di insorgenza della malattia più avanzata (pannello B).

Questi due fattori (la lunghezza del tratto GAA ripetuto e l'età di insorgenza della malattia) sono stati poi correlati e i dati così ottenuti sono stati inseriti in grafici suddivisi per sottogruppo di interruzione. Vediamo questa rappresentazione nella figura 3. Si può osservare come un tratto ripetuto più lungo sia correlato ad un'età di insorgenza molto precoce e si può anche notare come l'età di insorgenza nel sottogruppo con l'interruzione nell'estremità 3' sia più avanzata, come già osservato grazie alla mediana dei diagrammi a scatola.

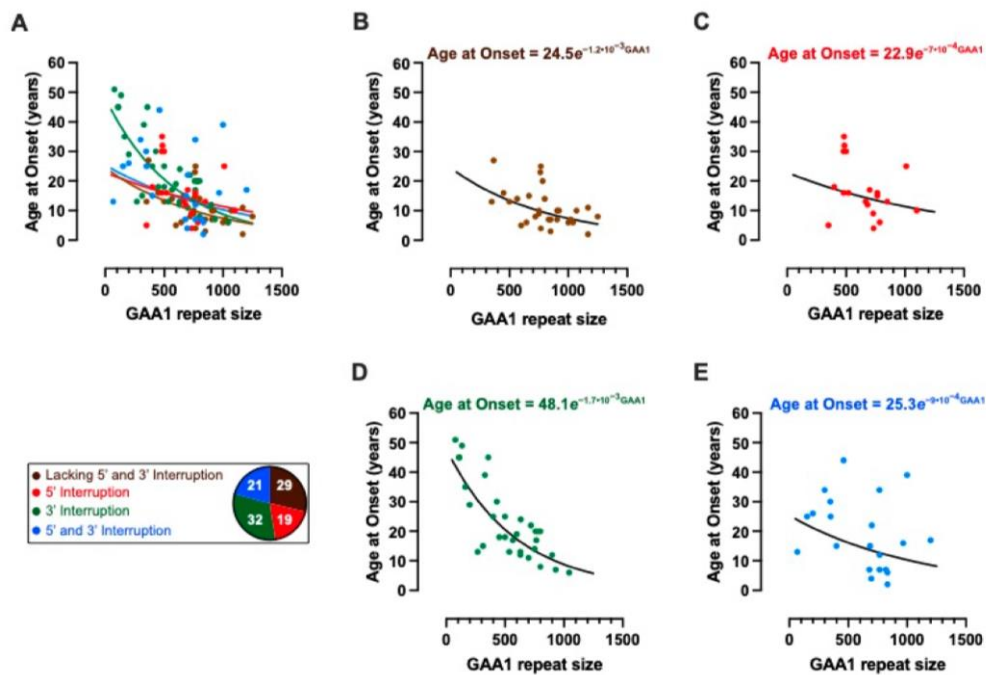


Figura 3. Correlazione tra età d'insorgenza della malattia e lunghezza del tratto ripetuto

Nel pannello A osserviamo rappresentati tutti i gruppi insieme in un diagramma che correla l'età d'insorgenza della malattia e lunghezza del tratto ripetuto. Nei pannelli B-E questa correlazione è rappresentata isolando i dati dei singoli sottogruppi

Viene dunque utilizzato il modello esponenziale per individuare la relazione presente tra la lunghezza del tratto ripetuto GAA e l'età di insorgenza della malattia, tenendo conto della divisione per sottogruppi.

Questo modello esponenziale permetterà poi di ricavare, per ogni sottogruppo, la costante con cui l'età d'insorgenza decresce in relazione alla lunghezza di tratto ripetuto.

3.3 Correlazione tra l'età di insorgenza effettiva e quella predetta

Un'altra rappresentazione grafica d'interesse è quella che ci permette di correlare l'età di insorgenza predetta e quella effettiva. Poter predire quando la malattia comincerà a manifestarsi può avere grossi vantaggi terapeutici e questo va ad incidere sulla qualità della vita del paziente. I risultati di questa analisi sono riportati nella figura 4.

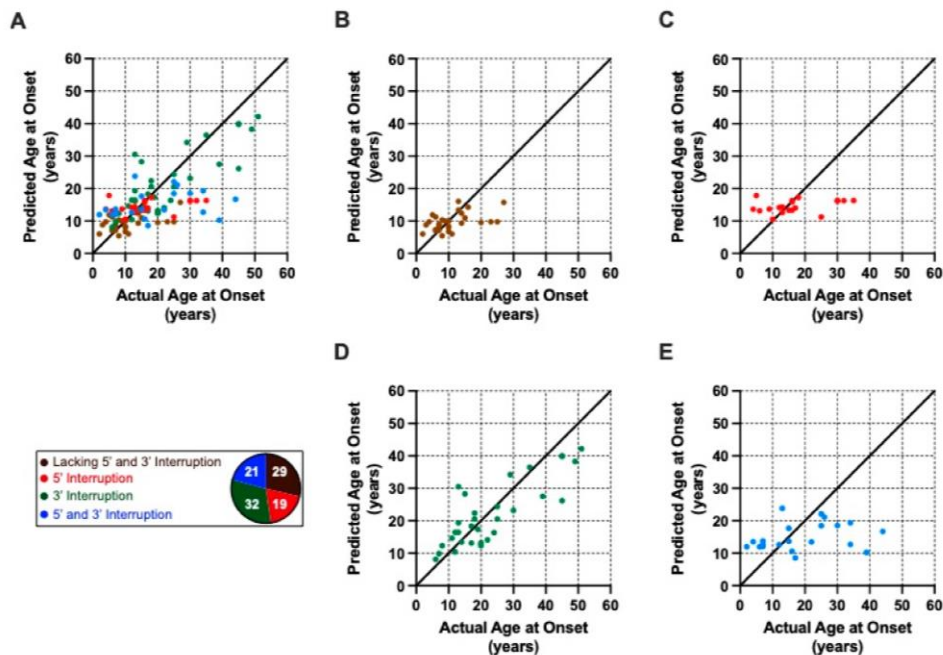


Figura 4. Correlazione tra l'età di insorgenza effettiva e quella predetta
 Nel pannello A sono rappresentati i dati di tutti i sottogruppi in un grafico che correla l'età effettiva di insorgenza della malattia con quella predetta. Nei grafici B-E questa correlazione è rappresentata isolando i singoli sottogruppi

Dai grafici possiamo osservare che nei pazienti che non presentano interruzioni in nessuna delle estremità del tratto ripetuto l'età di insorgenza predetta dai calcoli matematici coincide molto spesso (o si avvicina) con l'effettiva età di esordio. I pazienti con interruzioni nell'estremità 5' presentano una situazione simile o un po' migliore. I pazienti con interruzioni all'estremità 3' e i pazienti con interruzioni in entrambe le estremità presentano la malattia dopo l'età predetta. Possiamo osservare meglio questo fenomeno nel diagramma a scatola riportato nella figura 5.

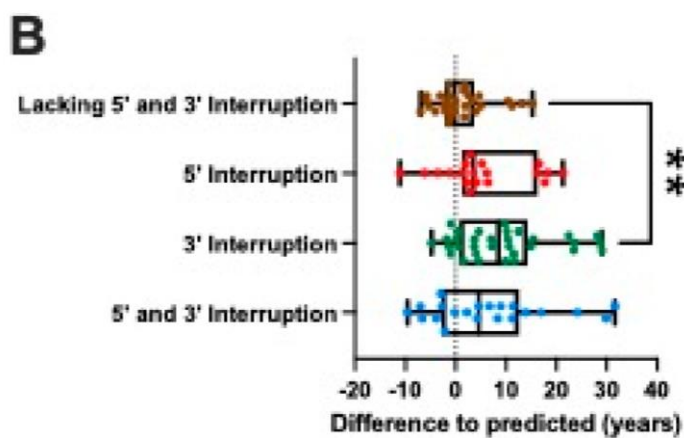


Figura 5. Differenza tra età d'insorgenza predetta ed età d'insorgenza effettiva nei sottogruppi

Il diagramma a scatola mostra, per ogni sottogruppo, i dati relativi alla differenza tra l'età di insorgenza predetta e quella effettiva. La linea tratteggiata si riferisce ad una differenza nulla (età d'insorgenza ed età predetta coincidono). I valori positivi si riferiscono ad un'insorgenza della malattia che è tardiva rispetto alla predizione.

In particolare, i pazienti affetti da atassia di Friedreich con interruzioni all'estremità 3' presentano i sintomi della malattia fino a 9 anni dopo l'età predetta dai modelli matematici.

Conclusione

Interruzioni nel tratto ripetuto GAA del gene *FXN* sono un parametro importante da considerare nel valutare l'età di insorgenza della malattia. In questo studio si è osservata la loro correlazione ed è stato possibile confermare la relazione tra lunghezza del tratto ripetuto e la presenza di tale interruzione utilizzando un modello esponenziale. Trattati che presentano interruzioni nell'estremità 3' sono anche i tratti più corti e quelli appartenenti a pazienti in cui l'esordio è più avanzato. Riuscire ad ottenere una buona stima dell'età di esordio della malattia permette di trattare adeguatamente i vari aspetti della malattia.

È importante ricordare che, pur avendo individuato tale correlazione, ci sono diversi meccanismi genetici ed epigenetici che possono influire sull'età di esordio e sulla severità della malattia come ad esempio i mosaicismi, altri geni regolatori o fattori ambientali.

Nonostante i numerosi studi che sono già stati conclusi e quelli in corso, ancora ci sono parecchie domande riguardanti le funzioni della proteina frataxina e come la sua espressione viene regolata. Studi futuri apriranno nuove frontiere sia per quanto riguarda la diagnostica ma soprattutto per quanto concerne gli approcci terapeutici.

Bibliografia

1. Al-Mahdawi S, Ging H, Bayot A, Cavalcanti F, La Cognata V, Cavallaro S, Giunti P, Pook MA. Large Interruptions of GAA Repeat Expansion Mutations in Friedreich Ataxia Are Very Rare. *Front Cell Neurosci.* 2018 Nov 21;12:443. doi: 10.3389/fncel.2018.00443. PMID: 30519163; PMCID: PMC6258883.
2. Busi MV, Gomez-Casati DF. Exploring frataxin function. *IUBMB Life.* 2012 Jan;64(1):56-63. doi: 10.1002/iub.577. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22095894.
3. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science.* 1996 Mar 8;271(5254):1423-7. doi: 10.1126/science.271.5254.1423. PMID: 8596916.
4. Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Dürr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet.* 1997 Oct;6(11):1771-80. doi: 10.1093/hmg/6.11.1771. PMID: 9302253.
5. Cook A, Giunti P. Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management. *Br Med Bull.* 2017 Dec 1;124(1):19-30. doi: 10.1093/bmb/ldx034. PMID: 29053830; PMCID: PMC5862303.
6. Li L, Matsui M, Corey DR. Activating frataxin expression by repeat-targeted nucleic acids. *Nat Commun.* 2016 Feb 4;7:10606. doi: 10.1038/ncomms10606. PMID: 26842135; PMCID: PMC4742999.
7. Nethisinghe S, Kesavan M, Ging H, Labrum R, Polke JM, Islam S, Garcia-Moreno H, Callaghan MF, Cavalcanti F, Pook MA, Giunti P. Interruptions of the *FXN* GAA Repeat Tract Delay the Age at Onset

of Friedreich's Ataxia in a Location Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 13;22(14):7507. doi: 10.3390/ijms22147507. PMID: 34299126; PMCID: PMC8307455.

8.Zhang S, Napierala M, Napierala JS. Therapeutic Prospects for Friedreich's Ataxia. *Trends Pharmacol Sci.* 2019 Apr;40(4):229-233. doi: 10.1016/j.tips.2019.02.001. PMID: 30905359; PMCID: PMC6826337.