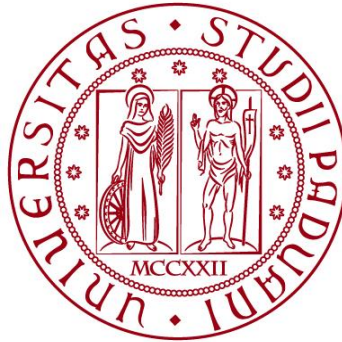


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**La carenza di fratassina altera l'espressione genica in  
neuroni e cardiomiociti iPSC derivati da atassia di  
Friedreich**

**Tutor: Prof.ssa Paola Costantini  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Federica Cavion**

**Laureanda: Chiara Mameli**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# Indice

Abstract.....	v
Stato dell'arte.....	1
Materiali e Metodi.....	4
Riprogrammazione cellulare e coltura iPSC.....	4
Differenziamento neuroni.....	5
Differenziamento cardiomiociti.....	6
Trascrizione inversa e qPCR.....	7
Generazione del plasmide di trasferimento.....	8
Produzione lentivirus, titolo e trasduzione.....	8
Western Blot capillare.....	9
RNA-Seq, analisi di espressione differenziale e analisi di arricchimento..	10
Risultati.....	11
Generazione di cardiomiociti e neuroni da iPSC e controllo.....	11
Espressione di fratassina.....	12
Determinazione del titolo lentivirale e concentrazione ottimale per trasduzione.....	13
Espressione differenziale dei geni in iN e iCM derivati da FRDA iPSC...	14
Analisi di arricchimento funzionale dei geni differenzialmente espressi di iN e iCM derivati da FRDA iPSC.....	15
Geni differenzialmente espressi in FRDA in neuroni e cardiomiociti derivati da iPSC FRDA vs. iPSC controllo recuperati con espressione di fratassina.....	16
Conclusioni.....	18
Limitazioni dello studio.....	20
Bibliografia.....	21



## **Abstract**

L'atassia di Friedreich è una malattia autosomica recessiva con decorso progressivo causata da un'espansione, in omozigosi, della ripetizione trinucleotidica GAA nel primo introne del gene codificante la fratassina, una piccola proteina mitocondriale. Sono state proposte diverse funzioni della proteina, ma nessuna ha spiegato completamente perché una carenza provochi i fenotipi dell'atassia e perché i tipi cellulari più colpiti siano neuroni e cardiomiociti. La FRDA, infatti, è una malattia neurodegenerativa progressiva ma la causa principale di morte è la cardiomiopatia, che si presenta nel 60% dei pazienti.

Nell'ottica della ricerca della funzione della proteina, si sono generati neuroni e cardiomiociti derivati da iPSC di un paziente affetto da FRDA e si è sovraespressa fratassina tramite trasduzione lentivirale senza alterare le ripetizioni GAA nel locus FXN.

Le successive analisi hanno dimostrato che la carenza di fratassina influisce sull'espressione dei geni della via glicolitica in neuroni e di geni codificanti proteine della matrice extracellulare in cardiomiociti. Questi geni sono stati espressi in modo differenziato rispetto ad un controllo negativo e confrontati con i livelli di controllo di cellule FRDA integrate con fratassina. I risultati hanno permesso di comprendere meglio il ruolo specifico della patogenesi della carenza di questa proteina in neuroni e cardiomiociti.



## Stato dell'arte

L'ataxia di Friedreich (FRDA) è una malattia neurodegenerativa autosomica recessiva con decorso progressivo, la cui principale causa è la presenza di un'espansione trinucleotidica GAA nel primo introne del gene codificante per la proteina fratassina (*FXN*). La lunghezza dell'espansione, che in cromosomi normali non supera le 40 ripetizioni e che in situazioni patologiche solitamente si espande oltre le 66 ripetizioni, porta a repressione della trascrizione del gene stesso.

La FRDA ha una prevalenza di 1 su 50000 individui nella popolazione caucasica e una frequenza di portatori da 1:60 a 1:100.

È considerata un disturbo multisistemico, tuttavia ne risentono maggiormente il sistema nervoso centrale e periferico, il sistema muscolo-scheletrico, il cuore e il pancreas. In particolare, i sintomi neurologici tipicamente compaiono nei primi dieci anni di vita a causa della degenerazione dei neuroni sensoriali nei gangli della radice dorsale, nel tratto cerebellare e spinocerebellare. La degenerazione neuronale porta a perdita di equilibrio e coordinazione, riduzione o perdita della sensibilità, debolezza muscolare e disartria. Altri sintomi frequenti, coinvolgenti il sistema muscolo-scheletrico, includono scoliosi, piede cavo ed equinismo. Circa il 60% dei pazienti sviluppa una forma di malattia cardiaca progressiva che appare simile alla cardiomiopatia ipertrofica primaria, ma caratterizzata da fibrosi cardiaca più marcata, disfunzione sistolica e aritmia (figura 1).

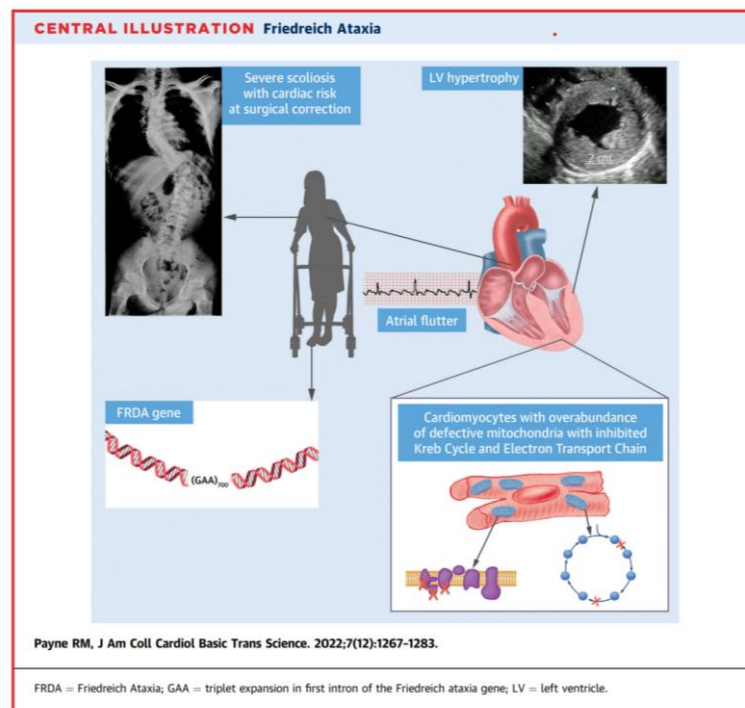


Figura 1. I sintomi e la causa molecolare dell'ataxia di Friedreich

Inoltre, il 20% dei pazienti FRDA presenta una frazione di eiezione ridotta nella seconda o terza decade di vita, in seguito al consolidamento della malattia neurologica. Ciononostante, il coinvolgimento cardiaco può variare notevolmente: sono stati riportati casi in cui questo può precedere la disfunzione neurologica e altri casi in cui non si manifesta affatto. Tra l'1% e il 32% delle persone affette, inoltre, presenta anche diabete mellito.

La causa più comune di morte in pazienti FRDA è l'insufficienza cardiaca e in minore frequenza ictus, ischemia e polmonite.

In una percentuale minore di casi, la sintomatologia si presenta in età più avanzata rispetto alla patologia classica ovvero con un fenotipo 'atipico', definito come 'delayed-onset'. Mentre il fenotipo classico si presenta solitamente tra i 10 e i 16 anni, quello 'late-onset' (tardivo) e 'very late-onset' (molto tardivo) si sviluppano rispettivamente dopo i 25 e 40 anni. In questi casi la sintomatologia appare meno grave e la progressione della malattia più lenta.

L'età di sviluppo e la gravità della malattia sono correlati tramite proporzionalità inversa al numero di ripetizioni della tripletta. [8]

La proteina fratassina, coinvolta nella malattia, è una piccola proteina acidica con punto isoelettrico intorno ad un valore di 4.9, altamente conservata nella maggior parte degli organismi. Sono identificabili due regioni distinte: una regione N-terminale di circa 70-90 aminoacidi, completamente assente in procarioti e poco conservata in eucarioti e una regione di 100-200 aminoacidi C-terminale estremamente conservata. In particolare, quest'ultima si ripiega in una struttura alfa-beta mista che consiste in due eliche impacchettate contro un foglietto beta antiparallelo adiacente.

La proteina viene espressa nel citoplasma sotto forma di precursore peptidico e successivamente importata nel mitocondrio, dove subisce un processo di maturazione proteolitica che la converte nella forma funzionalmente attiva. [2]

La funzione di fratassina non è ancora completamente nota, nonostante siano state proposte molteplici teorie. Risulta chiaro il suo coinvolgimento nella biogenesi dei centri ferro-zolfo, cofattori redox di numerose proteine coinvolte in funzioni cellulari importanti come la fosforilazione ossidativa, la regolazione genica e la catalisi enzimatica. La loro biogenesi avviene grazie ad una interazione diretta tra la proteina e il complesso centrale preformato di assemblaggio dei centri FeS. Nonostante la natura dell'interazione rimanga ancora sconosciuta, da un punto di vista cinetico è dimostrato che fratassina aumenta il tasso di formazione dei centri FeS.

Una deficienza della proteina causa un accumulo di ferro nei mitocondri, una maggiore suscettibilità a stress ossidativo e una riduzione dell'attività delle subunità contenenti centri FeS dei complessi I e II della catena respiratoria mitocondriale.



Difatti, la produzione insufficiente dei centri, dovuto ad un deficit di fratassina, attiva il meccanismo di recupero del ferro tramite l'espressione di diverse proteine con l'obiettivo di aumentare la biogenesi degli stessi. Tuttavia, a causa della mancanza di fratassina, l'assemblaggio dei centri viene impedito e il ferro non utilizzato viene accumulato e si ossida. La presenza di ferro ossidato nella cellula porta ad un aumento di specie reattive dell'ossigeno, inducendo stress ossidativo. La proteina fratassina non è coinvolta solo in questo processo, ma anche nell'omeostasi del ferro, nella regolazione delle reazioni redox nella cellula e nella sintesi dell'eme. [3]

Ciononostante, nessuna delle sue molteplici funzioni riesce a spiegare interamente la ragione per cui una sua carenza provochi i diversi fenotipi precedentemente esposti e perché la mancanza di una proteina che è ubiquitariamente espressa colpisca selettivamente neuroni e cardiomiociti.

Attualmente non sono presenti terapie efficaci approvate per prevenire la malattia: i processi terapeutici si concentrano principalmente sulla risoluzione della sintomatologia. È per questo importante generare modelli cellulari affidabili, che mostrino i processi molecolari legati all'atassia di Friedreich per poter studiare i meccanismi della patologia e identificare possibili *target* terapeutici.

Un interessante modello cellulare sono le cellule derivate da pazienti affetti da FRDA, in quanto portano con sé il locus FXN completo con l'espansione trinucleotidica GAA e le sequenze regolatorie. Dal momento che non è comune avere accesso a neuroni e cardiomiociti intatti dei pazienti, risulta essenziale e di fondamentale importanza per lo studio della malattia la capacità di stimolare il differenziamento di cellule pluripotenti staminali indotte (iPSCs) umane in neuroni e cardiomiociti, al fine di creare sistemi modello derivati direttamente da cellule del paziente. Questi modelli sono in grado di riprodurre in modo accurato la malattia stessa.

In questo studio, sono state generate iPSCs a partire da cellule mononucleate del sangue periferico prelevate da un paziente affetto da atassia di Friedreich con lo scopo di caratterizzare i neuroni indotti (iNs) e i cardiomiociti indotti (iCMs). Dato che la FRDA è una malattia progressiva che richiede anni per manifestarsi, ci si è focalizzati sullo studio di neuroni e cardiomiociti appena differenziati (con e senza reintroduzione di fratassina) al fine di analizzare i processi molecolari precoci associati alla mancanza di fratassina, indipendentemente dall'espansione GAA.

I risultati ottenuti, descritti nei capitoli successivi, indicano che una assenza di proteina potrebbe influenzare specificamente il processo glicolitico nei neuroni e la matrice extracellulare nei cardiomiociti, offrendo una nuova prospettiva sulle possibili differenze patologiche tra i due tipi di tessuti coinvolti nell'atassia.

## Materiali e Metodi

Per questo studio è stato reclutato un soggetto di 34 anni di sesso maschile affetto da atassia di Friedreich, omozigote, tramite la Clinica di Neurologia dell'Atassia di Friedreich presso la 'University of South Florida, Morsani College of Medicine'. Il paziente, di etnia caucasica, ha presentato i primi sintomi neurologici all'età di 8 anni con conseguente difficoltà nella camminata: i sintomi hanno continuato a progredire e, al momento del reclutamento per lo studio, il soggetto presentava difficoltà nel parlare, mancanza di coordinazione, problemi di equilibrio ed era costretto alla sedia a rotelle. I primi sintomi cardiaci si sono presentati come dolore al petto all'età di 28 anni, accompagnati da scoliosi, cifoscoliosi e osteoartrite della colonna vertebrale. Nei due alleli, l'espansione della tripletta nucleotidica GAA è rispettivamente 1092 e 781.

Il protocollo seguito per lo studio prevede inizialmente la riprogrammazione delle cellule prelevate dal paziente in iPSC, nelle quali verrà successivamente indotto il differenziamento in cardiomiociti e neuroni. Prima di procedere con i passaggi successivi, è necessario controllare e caratterizzare le cellule per assicurare che il differenziamento sia avvenuto correttamente, tramite i metodi di *immunostaining* e immunofluorescenza. Inoltre, vengono anche analizzate le ripetizioni della tripletta GAA. Una volta verificato il corretto differenziamento, si procede con la quantificazione dei livelli di FXN prodotta da queste cellule in confronto a quelli ottenuti dal controllo. Successivamente, queste cellule vengono trasdotte utilizzando lentivirus contenenti un plasmide in cui è stato inserito il gene *FXN*, al fine di indurre l'espressione. In seguito ad espressione, si controlla la possibile tossicità provocata da questa, per assicurarsi che la diluizione di lentivirus utilizzata per la trasduzione non sia tossica per le cellule. Infine, si caratterizza l'espressione del gene e della proteina tramite RNA-seq. e Western-Blot, rispettivamente.

### Riprogrammazione delle cellule e coltura iPSC

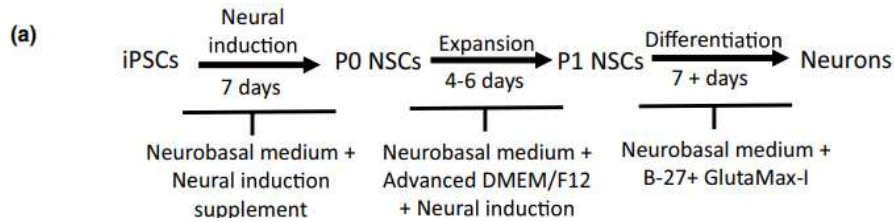
Le cellule iPSC sono state prodotte a partire dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) del paziente. Le PBMC del soggetto affetto sono state riprogrammate a iPSCs utilizzando il kit di riprogrammazione CytoTune™-iPS 2.0 Sendai. Sono state successivamente coltivate in terreno mTESR plus su piastre rivestite di Matrigel e passate una volta raggiunto il 60% di confluenza usando EDTA 0.5 mM. Durante il processo, le cellule sono state mantenute ad una temperatura di 37 °C, con una concentrazione di CO<sub>2</sub> del 5% e un'umidità relativa dell'85% e il terreno di coltura cambiato ogni due giorni.

La linea cellulare di controllo è stata acquistata da ATCC e mantenuta in coltura come descritto precedentemente.

## Differenziamento neuroni

Una volta ottenuta la coltura di cellule staminali pluripotenti indotte, si è proseguito con il differenziamento delle iPSC in neuroni e cardiomiociti.

Per il differenziamento neuronale, lo schema seguito è il seguente:



Le iPSC sono state seminate in modo da raggiungere circa il 15-20% di confluenza sulle piastre di Matrigel dopo 1 giorno dalla loro separazione. A questa confluenza, il terreno mTESR plus è stato sostituito con un terreno di induzione neuronale preriscaldato, che è stato sostituito ogni 2 giorni fino al settimo giorno. Al settimo giorno, le iPSC si sono differenziate in cellule staminali neuronali (NSC): quest'ultime sono state disgregate tramite StemPro Accutase, una soluzione di enzimi proteolitici e collagenolitici, espanso con terreno di espansione neuronale e caratterizzate prima del successivo differenziamento.

La caratterizzazione è stata eseguita tramite *immunostaining*, sia del controllo che delle cellule staminali neuronali derivate da iPSC. La tecnica dell'*immunostaining* implica l'utilizzo di anticorpi per rilevare una specifica proteina in un campione, e in questo contesto, viene utilizzata per caratterizzare le cellule e confermare il loro corretto differenziamento.

Per la caratterizzazione delle cellule staminali neuronali sono stati utilizzati diversi *markers*: i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu), colorante organico fluorescente che lega fortemente le sequenze di DNA ricche in sequenze A-T. Inoltre, sono state ricercate le proteine nestina e Sox2. Sia le cellule del controllo che le NSC hanno presentato l'espressione di entrambi i *markers*.

In seguito ad espansione e caratterizzazione, le cellule staminali embrionali correttamente differenziate sono state disgregate e seminate su piastre rivestite di Matrigel con terreno di differenziamento neuronale. Il terreno è stato sostituito ogni 2 giorni per un totale di 7 giorni.

I neuroni ottenuti sono stati osservati e caratterizzati tramite *immunostaining*: i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu) ed è stata ricercata, sia nelle cellule di controllo che nei neuroni indotti, l'espressione dei *markers* doublecortina DCX (verde) e MAP2 (rosso). Doublecortina (DCX) è una fosfoproteina associata ai microtubuli (MAP), coinvolta nella loro stabilizzazione. Si tratta di una proteina specifica del sistema nervoso, che viene espressa in neuroni migranti sia del sistema nervoso centrale che di quello periferico durante lo sviluppo embrionale e postnatale. DCX è, inoltre,

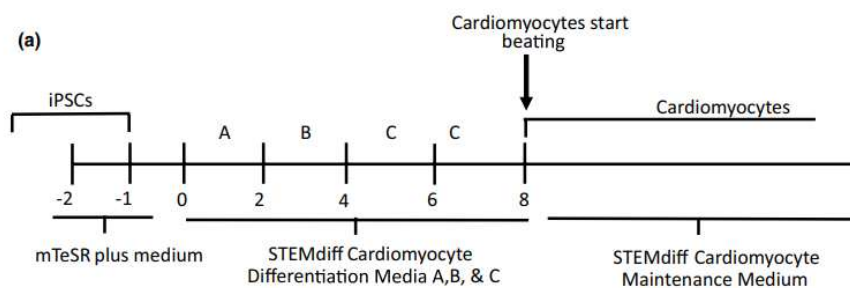
fondamentale per la proliferazione delle cellule progenitrici durante la neurogenesi, contribuendo alla formazione del cono di crescita e all'estensione dendritica. La mancanza di DCX comporta una significativa deplezione del *pool* di cellule progenitrici durante lo sviluppo corticale, rendendola un ottimo *marker* per osservare il corretto sviluppo dei neuroni. [4]

MAP2 è una proteina specifica dei neuroni coinvolta nella stabilizzazione dei microtubuli, che aiuta la riduzione della frequenza di eventi di depolarizzazione e facilita la formazione e la maturazione della struttura dendritica. La proteina viene espressa in seguito al passaggio della cellula dallo stadio di precursore neuronale allo stadio di neurone e le sue isoforme sono espresse in modo differenziale durante il neurosviluppo. [6]

Oltre alla tecnica dell'*immunostaining*, le cellule sono state oggetto di analisi tramite PCR della regione ripetuta GAA e qPCR al fine di quantificare i livelli di mRNA di fratastina.

## Differenziamento cardiomiociti

Le cellule iPSC derivate dal soggetto effetto e dal controllo sono state differenziate in cardiomiociti con l'utilizzo del kit di differenziamento dei cardiomiociti STEMdiff<sup>TM</sup>, seguendo il seguente protocollo:



Le cellule sono state seminate su piastre rivestite di matrigel con terreno mTSER plus fino al raggiungimento del 95% di confluenza: a questo punto, il terreno è stato cambiato in STEMdiff<sup>TM</sup> Cardiomyocyte Differentiation Medium A con matrigel per 2 giorni, seguito da STEMdiff<sup>TM</sup> Cardiomyocyte Differentiation Medium B per 2 giorni e, infine, STEMdiff<sup>TM</sup> Cardiomyocyte Differentiation Medium C per 4 giorni. All'ottavo giorno si inizia ad osservare la contrazione delle cellule che vengono successivamente mantenute con Maintenance Medium, cambiato a giorni alterni.

In seguito a differenziamento, la popolazione di cellule risulta ancora non pura, presentando una importante percentuale di cellule non cardiomiocitiche. Al fine di eliminarle quest'ultime, la popolazione cellulare è stata purificata tramite selezione metabolica, utilizzando un terreno di coltura a bassissimo contenuto di glucosio per

5 giorni. Questo trattamento ha permesso di eliminare selettivamente cellule non cardiomiocitiche grazie all'abilità dei cardiomiociti di utilizzare il lattato per ottenere energia al fine di sopravvivere in un ambiente privo di glucosio. In seguito a questo passaggio è stato osservato un aumento del 40% nel rapporto tra cardiomiociti ed altre cellule. [4]

Per gli esperimenti di caratterizzazione, le cellule sono state disgregate con un terreno di dissociazione per cardiomiociti e sottoposte ad *immunostaining*, con la ricerca dell'espressione dei *markers* tropomiosina (rosso) e  $\alpha$ -actinina (verde).

Tropomiosina è una proteina filamentosa presente nelle miofibrille, caratterizzata da una struttura alfa-elicoideale a spirale. I suoi dimeri formano dei complessi intermolecolari testa-coda, i quali danno luogo ad un lungo polimero continuo che si va a collocare lungo il solco maggiore dei filamenti di actina. Esistono diverse isoforme di tropomiosina, tutte accomunate dal loro coinvolgimento nella contrazione muscolare.

Alfa-actinina è una proteina appartenente alla superfamiglia delle spettine. Ha collocazione ubiquitaria e la capacità di *cross-linkare* filamenti di actina nei primi stadi di differenziamento del muscolo cardiaco. [7]

In aggiunta all'*immunostaining*, le cellule sono state sottoposte ad analisi tramite PCR della regione ripetuta GAA e qPCR al fine di quantificare i livelli di mRNA di fratassina.

## **Trascrizione inversa e qPCR**

Le cellule sono state lisate con un tampone di lisi RLT, contenente guanidina tiocianato per favorire il legame dell'RNA alla membrana in silice usata per l'estrazione, e omogenizzate. L'estrazione è stata portata a termine con il kit RNeasy Mini kit, tecnologia che sfrutta *spin columns* con membrane di silice per il legame dell'estratto genomico.

Si è proseguito con trascrizione inversa per ottenere il cDNA da utilizzare successivamente per la quantificazione: 2  $\mu$ g di RNA sono stati miscelati con 4  $\mu$ l di master mix Superscript IV VILO contenente l'enzima trascrittasi inversa Superscript IV e acqua trattata con DEPC per assicurare l'inattivazione di RNAsi che potrebbero degradare il campione.

I campioni sono stati incubati e il cDNA ottenuto è stato utilizzato il successivo passaggio di PCR quantitativa: l'amplificazione è stata eseguita con il sistema StepOnePlus <sup>TM</sup>, utilizzando TaqMan Fast Advanced Master Mix contenente l'enzima AmpliTaq Fast DNA polimerasi, uracile N-glicosilasi, dNTPs con dUTP e ROX dye ed utilizzando le sonde di espressione genica TaqMan FXN.

Il colorante Rox dye è un componente indispensabile per la normalizzazione del segnale di fluorescenza del reporter, poiché fornisce una fluorescenza di fondo, mentre la normalizzazione dell'espressione degli mRNA è stata realizzata confrontando l'espressione di fratassina con l'espressione dell'mRNA dell'enzima gliceradeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

Un gene di riferimento, come GAPDH, è solitamente un gene *housekeeping* o costitutivo, codificante una componente fondamentale per la sopravvivenza della maggior parte delle cellule e la cui espressione si mantiene relativamente costante nel tempo. Questo gene di riferimento è una componente necessaria per permettere la quantificazione relativa dei livelli di mRNA del gene di interesse, in quanto viene confrontato ai livelli di espressione del gene *housekeeping*: in particolare, si effettua la normalizzazione sfruttando il  $\Delta C_t$  ovvero la differenza tra i cicli soglia dei due campioni. Il ciclo soglia di un campione di PCR è il ciclo nel quale si misura un valore di fluorescenza del campione almeno dieci volte superiore al valore del *background*, associato quindi ad una crescita esponenziale dei prodotti di PCR. La formula applicata è  $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ . [8]

## Generazione del plasmide di trasferimento

Successivamente, si è preparato il plasmide di trasferimento, il quale è stato ottenuto da Addgene: è stato scelto il plasmide pcDNA3.1-hFrataxin-HA (31895). Poiché studi precedenti hanno dimostrato che livelli elevati di frataxina possono essere tossici per la cellula, il plasmide è stato modificato sostituendo il promotore con un promotore costitutivo debole (UbC), al fine di controllare meglio la sovraespressione della proteina.

Per generare il prodotto di PCR, contenente frataxina, da coniugare all'interno del plasmide, sono stati sintetizzati *primer forward* 5' GCTCGCTAGCGCCACCATGTGGACTCTCGCG-3' e *primer reverse* 5'-GCCCGGATCCTCAAGCATTTCGGGAATAGGCC-3'.

Il prodotto ottenuto risulta fiancheggiato da un sito di restrizione per NHEI all'estremità 5' e un sito di restrizione per BAMHI all'estremità 3'.

Per una corretta generazione del plasmide, sia il prodotto che il plasmide ottenuto da Addgene sono stati digeriti con le endonucleasi di restrizione NHEI e BAMHI, in modo tale da ottenere estremità sporgenti complementari. In seguito a digestione e purificazione in gel del prodotto, si è proseguito con la ligazione tramite ligasi T4 per coniugare l'inserto purificato all'interno del plasmide.

Per verificare il corretto avvenimento della coniugazione e l'espressione finale dei plasmidi si è ricorsi a sequenziamento Sanger.

## Produzione lentivirus, titolo e trasduzione

Per la produzione di lentivirus contenenti il gene *FXN*, gli autori hanno seminato le cellule HEK293T (linea immortalizzata di cellule renali embrionali) in piastre rivestite di poli-lisina in 5 ml di terreno di coltura privo di antibiotici, in modo tale che il giorno successivo la confluenza fosse di circa il 70%. Il giorno seguente, le cellule sono state trasfettate utilizzando il reagente di trasfezione Lipofectamina 3000 secondo le istruzioni del produttore. Inoltre, per la trasfezione sono stati utilizzati 1,25  $\mu$ g di plasmide di envelope pCMV-VSV-G, 1,25  $\mu$ g di plasmide di packaging psPAX2 e 2,5  $\mu$ g di plasmide di trasferimento contenente il gene frataxina.

Il giorno successivo alla trasfezione, il terreno è stato sostituito con 5 ml di terreno contenente antibiotici. Dopo due giorni, il terreno contenente lentivirus è stato raccolto, filtrato e conservato a 4°C, mentre alle cellule trasfettate sono stati aggiunti ulteriori 5 ml di terreno con antibiotici. Due giorni dopo, il terreno è stato nuovamente raccolto, filtrato e mescolato con il terreno raccolto in precedenza. I campioni prelevati sono stati aliquotati e congelati a -80°C in attesa della successiva analisi e trasduzione.

Per determinare il titolo lentivirale è stato utilizzato il kit Lenti-X GoStix Plus, secondo le istruzioni del produttore. Questo kit permette di rilevare in soli 10 minuti la presenza di lentivirus nel surnatante applicando 20 µl di questo nel pozzetto per campioni della cassetta Lenti-X GoStix Plus tramite sistema di *lateral flow*. A questa analisi qualitativa è possibile accoppiarne una di tipo quantitativo grazie ad una applicazione che quantifica il titolo lentivirale, comparando le intensità delle bande con una curva standard. Dal momento che il campione non era concentrato, sono stati analizzati sia il campione non diluito che il campione con una diluizione 1:2 per garantire una lettura all'interno dell'intervallo della curva standard.

Per determinare la concentrazione ottimale di surnatante lentivirale da utilizzare per la trasduzione di iN e iCM FRDA, è stato necessario valutare le diverse diluizioni del lentivirus tramite PCR quantitativa.

La trasduzione delle cellule è avvenuta il giorno 15 e, il giorno successivo, il terreno di coltura è stato cambiato per andare a rimuovere lentivirus residui. Successivamente, il giorno 30, le cellule trasdotte sono state lisate ed è stato estratto l'RNA per andare a valutare i livelli di espressione di fratassina tramite RT-PCR e confrontarli rispetto alle cellule di controllo e non trasdotte. La concentrazione da utilizzare nella trasduzione è stata scelta in modo da ottenere una produzione di mRNA FXN più simile possibile a quella delle cellule di controllo.

## **Western Blot capillare**

Al fine di rilevare, analizzare e quantificare la produzione e la presenza della proteina fratassina nelle cellule trasdotte, si è ricorsi alla tecnica del Western Blot. Si tratta di una tecnica biochimica che prevede il trasferimento di macromolecole da un gel, nel quale è avvenuta la separazione elettroforetica di queste, ad una membrana immobilizzante, solitamente di nitrocellulosa. La rilevazione della presenza delle proteine avviene grazie ad anticorpi.

La tecnica di Western Blot capillare automatizzato permette la velocizzazione del sistema, automatizzando i processi di separazione elettroforetica, marcatura con anticorpi e visualizzazione di questi tramite l'utilizzo di un macchinario Protein Simple. A differenza della tecnica di Western Blot tradizionale, le proteine separate sono covalentemente legate alla parete capillare, eliminando il passaggio di trasferimento delle stessa alla membrana di nitrocellulosa. Con questo metodo, l'operatore ha il compito di caricare i campioni, mentre il resto del processo viene gestito automaticamente dal macchinario che fornisce direttamente i risultati.

Le cellule da analizzare sono state lisate utilizzando il tampone di lisi RIPA con inibitori di proteasi e fosfatasi. I lisati sono stati sonicati e centrifugati e, successivamente, la concentrazione di proteine determinata con un saggio Bradford. Le analisi di Western Blot capillare sono state eseguite con il sistema ProteinSimple Wes: i campioni sono stati diluiti con 0,1 x *sample buffer* e le quattro parti di campione diluito combinate con una parte di 5 x Fluorescent Master Mix, la quale contiene *sample buffer*, *fluorescent standard* e 200 mM di ditionitrotolo (DTT). In seguito ad incubazione, i campioni, il reagente bloccante, gli anticorpi primari, gli anticorpi secondari coniugati con HRP e il substrato luminescente sono stati distribuiti su una piastra a 13 pozzetti. Dopo il caricamento della piastra, le fasi di separazione elettroforetica e *immunodetection* sono avvenute nel sistema capillare completamente automatizzato.

## **RNA-Seq, analisi di espressione differenziale e analisi di arricchimento**

Per concludere, gli autori hanno portato a termine una analisi di RNA-seq per misurare l'abbondanza del gene e del trascritto d'interesse ed andare ad analizzare l'espressione differenziale di questo.

L'RNA è stato isolato come descritto nella sezione precedente di trascrizione inversa e qPCR e la sua concentrazione e purezza determinate con il lettore Cytation 5. Successivamente, il sequenziamento è stato portato a termine per tre repliche biologiche di ciascun gruppo di studio presso Novogene Co. Ltd per l'analisi RNA-Seq e di espressione differenziale. Per ogni campione è stato utilizzato 1 µg di RNA come materiale di *input* per la preparazione dei campioni e la generazione delle librerie di sequenziamento. Ogni campione è stato marcato con un index code in modo da permettere, in seguito, il loro riconoscimento e il raggruppamento dei risultati. Successivamente alla generazione dei *clusters*, i preparati delle librerie sono stati sequenziati tramite piattaforma Illumina producendo letture *paired end*, ossia letture a partire da entrambe le estremità del filamento e in direzioni opposte. Le letture ottenute sono state pulite rimuovendo le letture contenenti sequenze adattatore, poli-N e letture di bassa qualità. Una volta ottenute le letture pulite, sono state allineate al genoma di riferimento tramite software per contare il numero di letture mappate di ciascun gene.

I dati ottenuti sono stati successivamente analizzati per valutare l'espressione differenziale dei geni e per eseguire analisi di arricchimento, includendo la visualizzazione dei *network* significativi dei percorsi maggiormente arricchiti.

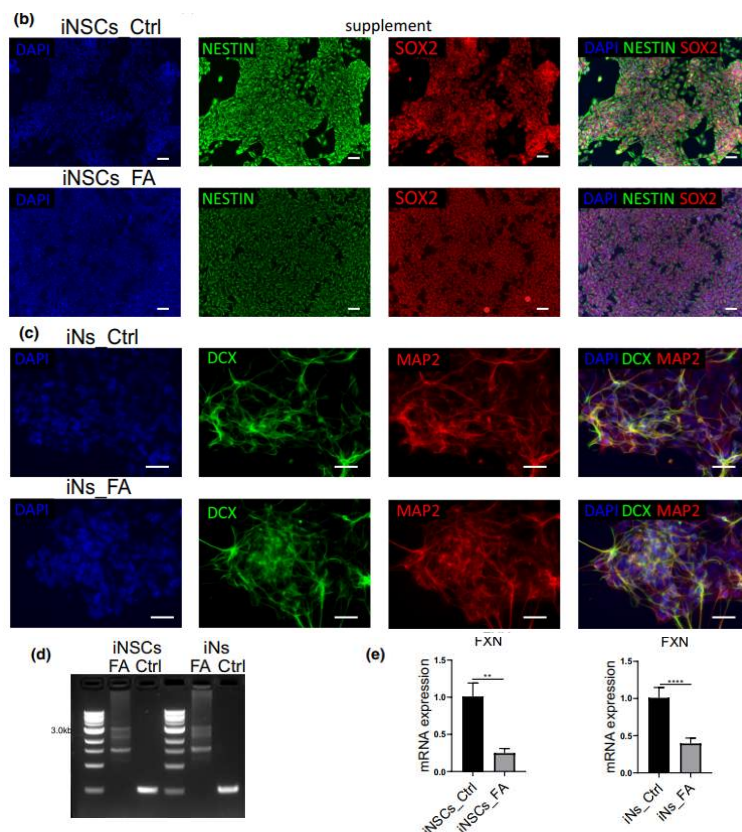


## Risultati

### Generazione di cardiomiociti e neuroni da iPSC e controllo

Il processo di generazione di cardiomiociti e neuroni si è dimostrato efficace sia a partire da iPSC FRDA che da cellule iPSC di controllo derivate da un individuo sano, con un numero di ripetizioni GAA minore di 10.

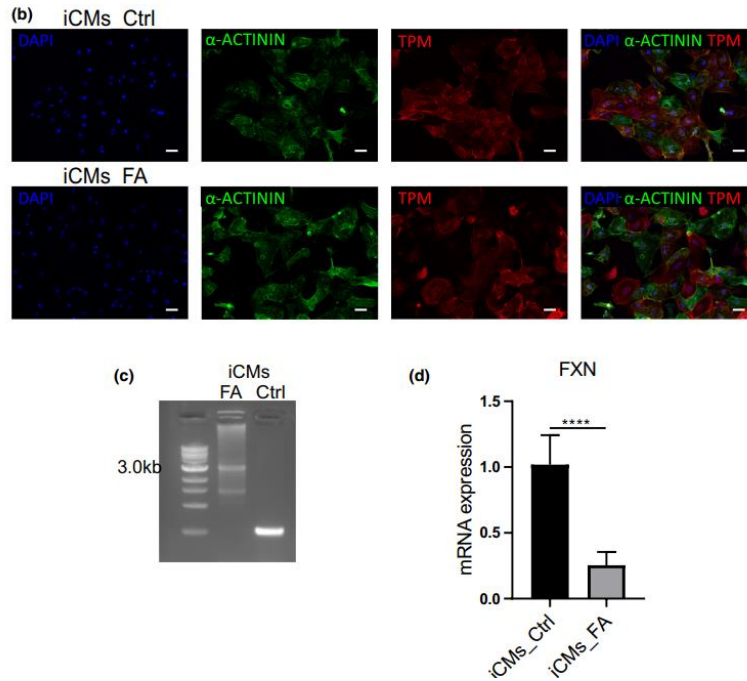
Per quanto riguarda il differenziamento neuronale, le cellule sono state prima indotte a diventare cellule staminali neurali, la cui caratterizzazione ha dimostrato l'espressione dei marcatori Nestina e Sox2 (figura 2).



**Figura 2.** Caratterizzazione iNs. (b) *immunostaining* controllo e paziente. (c) analisi PCR delle ripetizioni GAA da iNSC e iNs di controllo. (d) quantificazione (qPCR) livelli mRNA *FXN* di controllo e paziente

Nelle cellule derivate dal soggetto FRDA è risultata conservata l'espansione della tripletta nucleotidica GAA e il livello di mRNA di fratassina, analizzato con RT-PCR, ha dimostrato che queste NSC presentano un'importante riduzione di FXN rispetto a quelle derivate dal controllo. Il successivo differenziamento in neuroni ha portato allo sviluppo di neuroni completamente differenziati con la tipica morfologia neuronale, caratterizzati da cellule arrotondate con prolungamenti che le collegavano tra loro. Inoltre, i neuroni hanno mantenuto l'espansione GAA, esprimevano sia il marcatore DCX che MAP2 ed esprimevano livelli di FXN più bassi rispetto alle cellule derivate dal controllo.

Per il differenziamento dei cardiomiociti, le cellule differenziate esprimevano entrambi i marcatori ricercati (alpha-actinina e tropomiosina) (figura 3) e mostravano contrazioni spontanee.

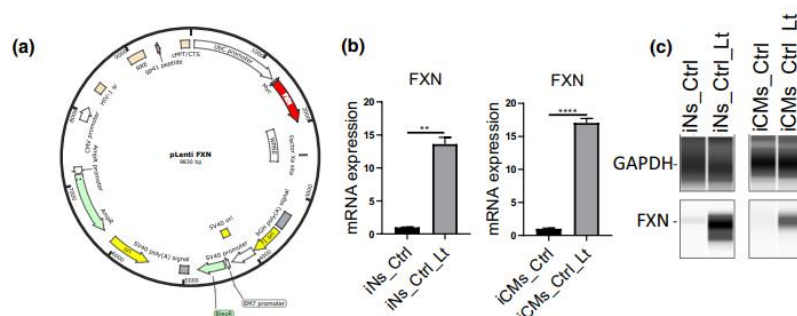


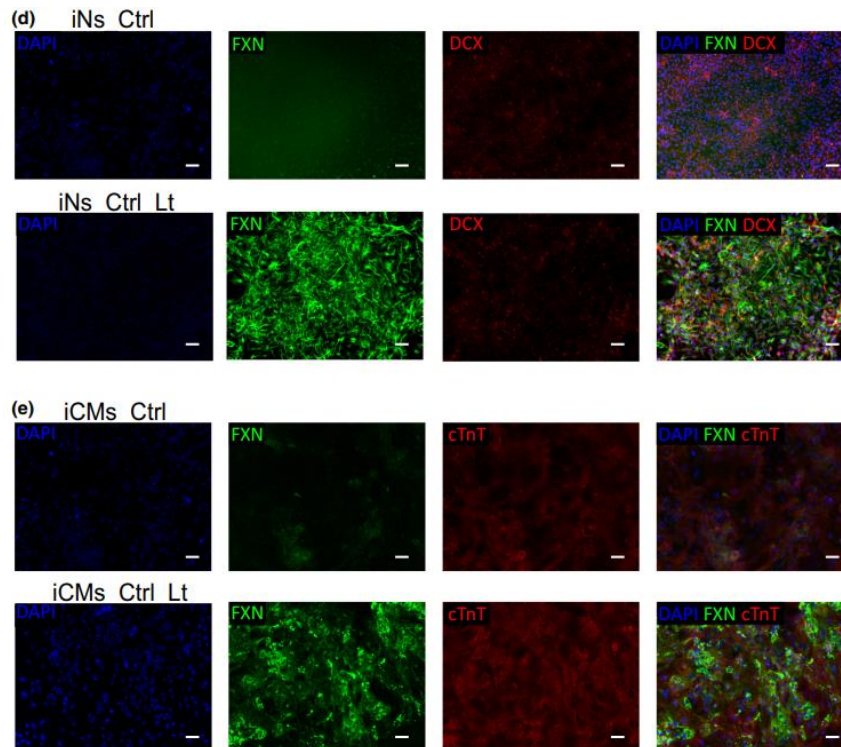
**Figura 3.** Caratterizzazione iCMs. (b) *immunostaining* di iCMs di controllo e paziente. (c) analisi di PCR delle ripetizioni GAA in iCMs di controllo e paziente. (d) quantificazione (qPCR) livelli di mRNA *FXN* di controllo e paziente

Le cellule hanno mantenuto l'espansione GAA ed espresso livelli inferiori di FXN rispetto ai cardiomiociti derivati dalla linea cellulare di controllo.

## Espressione di fratassina

L'espressione di fratassina nelle cellule iN e iCM ottenuta tramite trasduzione lentivirale è stata prima testata su cardiomiociti e neuroni derivati dalla linea cellulare di controllo. Le cellule sono state raccolte ed analizzate due settimane dopo la trasduzione, per garantire che la sovraespressione di fratassina non fosse un evento transitorio, e i livelli di mRNA ottenuti risultavano aumentati di oltre 10 volte nelle cellule trasdotte rispetto a quelle non trasdotte (figura 4).





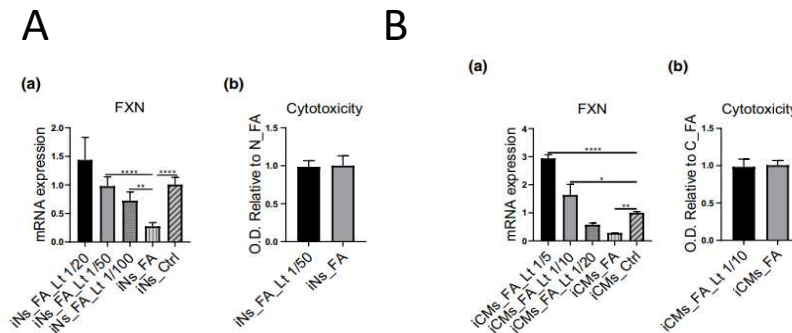
**Figura 4.** Validazione lentivirus. (a) plasmide di trasferimento modificato. (b) quantificazione (qPCR) livelli di mRNA *FXN* in iNs e iCMs di controllo trasdotti e non trasdotti. (c) rilevamento fratassina con Western Blot capillare. (d) immunostaining iNs di controllo trasdotti e non trasdotti (e) *immunostaining* iCMs di controllo trasdotti e non trasdotti

Inoltre, tramite Western Blot, è stato determinato che il trascritto veniva tradotto in proteina, in quanto è stato osservato un incremento di fratassina sia in cardiomiociti che neuroni (figura 4). Successivamente, un'ulteriore analisi tramite immunofluorescenza ha dimostrato che la sovraespressione era uniformemente distribuita tra le cellule. Pertanto, questo metodo di trasduzione lentivirale risulta adatto per indurre la sovraespressione di fratassina in cardiomiociti e neuroni derivati da iPSC e può essere utilizzato per integrare i livelli di fratassina in cellule FRDA.

### **Determinazione del titolo lentivirale e concentrazione ottimale per trasduzione**

Al fine di ripristinare i livelli di fratassina in cellule FRDA in modo tale da ottenere livelli più simili possibili ai livelli di controllo, è stato necessario determinare il titolo lentivirale adeguato alla trasduzione. Gli autori hanno fatto ciò utilizzando un saggio per la quantificazione della proteina capsidica p24 nei surnatanti lentivirali, la quale è direttamente correlata al titolo virale infettivo. È stato ottenuto un valore di 270 ng/ml e le cellule sono state trasdotte con diverse diluizioni di questo, per poter quantificare, tramite RT-PCR, il valore migliore per

ottenere i livelli di fratassina desiderati. Per la trasduzione di neuroni FRDA è stata scelta una diluizione di lentivirus di 1/50 (5,4 ng/ml), mentre per la trasduzione di cardiomiociti FRDA è stata scelta una diluizione di 1/10 (27 ng/ml). Entrambe le diluizioni non si sono dimostrate tossiche per le cellule in seguito a saggio di citotossicità (figura 5).

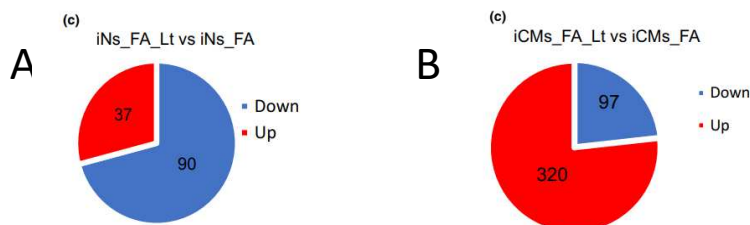


**Figura 5.** Trasduzione lentivirale in iNs e iCMs (A) quantificazione (qPCR) livelli di mRNA *FXN* in iNs trasdotti con diverse diluizioni lentivirali e saggio di citotossicità per determinare se la diluizione scelta fosse tossica per i iNs (B) quantificazione (qPCR) livelli di mRNA *FXN* in iCMs trasdotti con diverse diluizioni lentivirali e saggio di citotossicità per determinare se la diluizione scelta fosse tossica per i iCMs

## Espressione differenziale dei geni in iN e iCM derivati da FRDA iPSC

Per indentificare i *pattern* di espressione genica correlati all’atassia di Friedreich e i geni regolati dai livelli di fratassina in neuroni indotti e cardiomiociti indotti, sono state condotte analisi di RNA-seq sia su cellule trasdotte che non trasdotte, derivate dal paziente affetto.

Complessivamente, nelle cellule neuronali sono stati identificati 127 geni espressi in modo differenziale, 37 dei quali risultavano “upregolati” e 90 “downregolati”. Per quanto riguarda gli iCM, sono stati individuati 417 geni espressi in modo differenziale, di cui 320 “upregolati” e 97 “downregolati” in seguito a trasduzione lentivirale (figura 6).

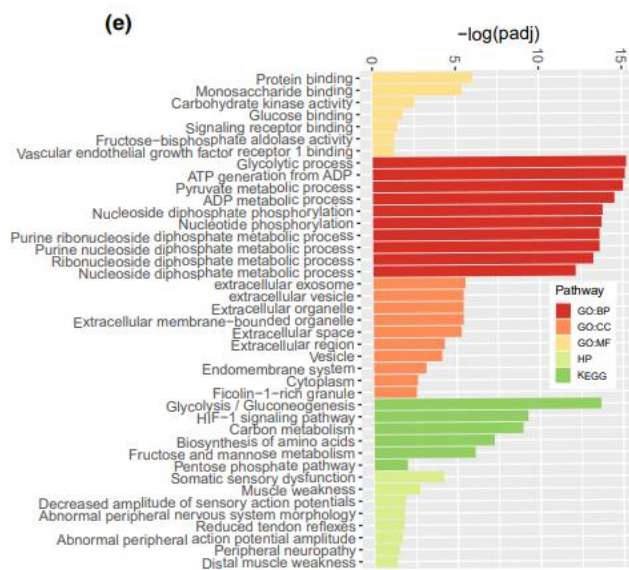


**Figura 6.** Diagramma di Venn dei geni differenzialmente espressi in cellule trasdotte e non. (A) geni DE in iNs. (B) geni DE in iCMs

## Analisi di arricchimento funzionale dei geni differenzialmente espressi di iN e iCM derivati da FRDA iPSC

Per poter comprendere le potenziali funzioni dei geni espressi in modo differenziale nelle cellule, gli autori hanno eseguito un'analisi di arricchimento funzionale.

Nel caso dei neuroni, i processi più significativamente arricchiti sono risultati quelli legati al metabolismo dei carboidrati, come la glicolisi, la generazione di ATP e i processi metabolici di ADP e piruvato (figura 7).

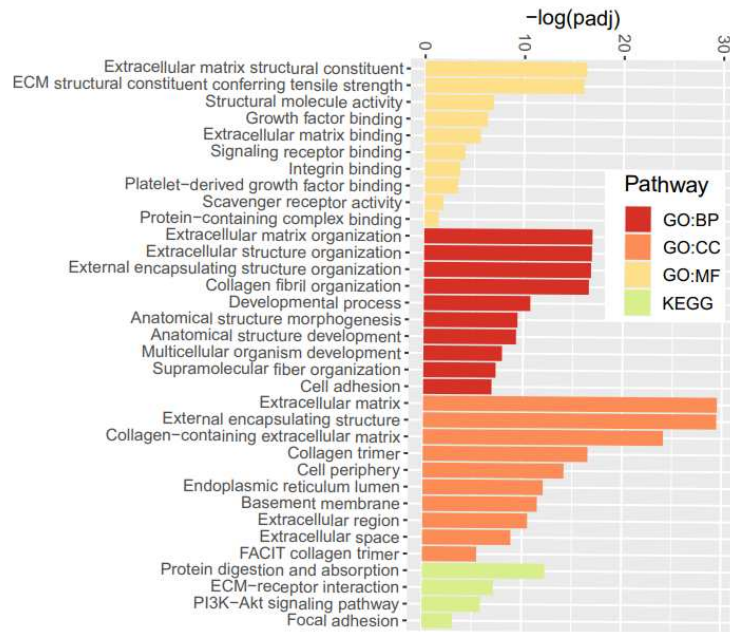


**Figura 7.** Analisi di arricchimento di geni DE su iNs trasdotti e non trasdotti

Questi risultati sono coerenti con studi precedenti, i quali hanno indicato in soggetti affetti da FRDA un anormale metabolismo del glucosio, nonché un rischio aumentato di diabete. Inoltre, nei pazienti si sono evidenziati livelli minori di ATP che vengono ripristinati con un aumento dei livelli di fruttosina. Relativamente ai *pathways* biologici basati sul database Kegg, i più significativamente arricchiti includono glicolisi e gluconeogenesi, ma anche HIF-1 e metabolismo del carbonio tra gli altri *pathways* correlati. Infine, dall'analisi dell'ontologia del fenotipo umano, la quale collega i geni alle anomalie fenotipiche riscontrate nelle malattie, gli autori hanno ottenuto caratteristiche dell'ataxia di Friedreich, quali disfunzioni sensoriali, debolezza muscolare e neuropatia periferica.

Per quanto riguarda i cardiomiociti, i caratteri più significativamente arricchiti sono risultati associati ai processi e ai componenti della matrice extracellulare, quali l'organizzazione della stessa e l'organizzazione delle fibrille di collagene (figura 8).





**Figura 8.** Analisi di arricchimento di geni DE in iCMs trasdotti e non trasdotti

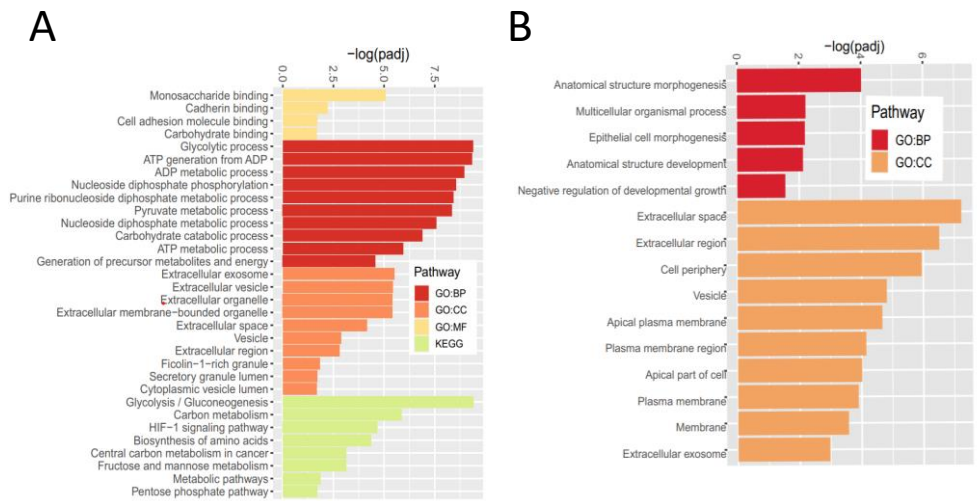
Ciò risulta coerente con la presenza di fibrosi cardiaca osservata in pazienti FRDA, la quale è una conseguenza del rimodellamento della matrice extracellulare dovuto a processi patologici. È stato anche riscontrato un arricchimento nelle vie della matrice extracellulare, tra cui l'interazione matrice-recettore e l'adesione focale.

### **Geni differenzialmente espressi in FRDA in neuroni e cardiomiociti derivati da iPSC FRDA vs. iPSC controllo recuperati con espressione di fratassina**

Con lo scopo di approfondire ulteriormente il ruolo della carenza di fratassina nell'ataxia di Friedreich, gli autori hanno condotto un'analisi dei geni espressi in modo differenziale nelle cellule FRDA, rispetto alle cellule di controllo, nelle quali viene ripristinata l'espressione di fratassina tramite trasduzione lentivirale.

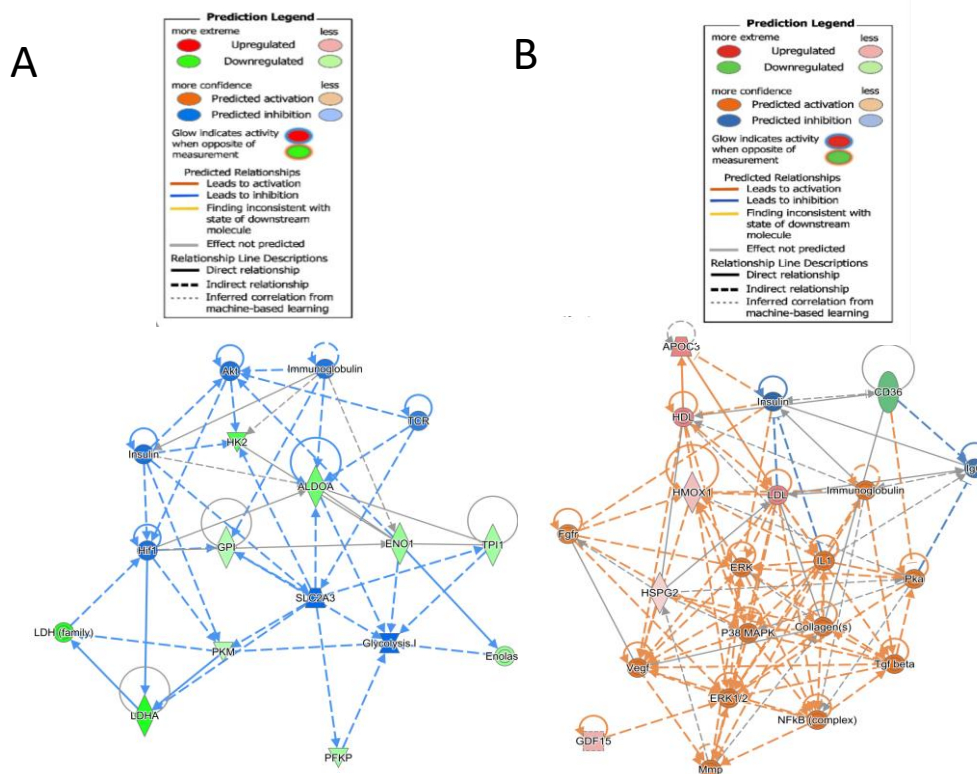
Sono stati condotti esperimenti di RNA-seq su iN e iCM derivati da iPSC con FRDA e derivati da controllo. Sono stati analizzati i geni FRDA corretti ai livelli di trascrizione dei rispettivi controlli in seguito a trasduzione lentivirale, e successivamente si è proseguito con analisi di arricchimento funzionale per determinare i *pathways* e i processi biologici sovrarappresentati.

Nei neuroni, i processi più significativamente arricchiti sono risultati essere la glicolisi, la generazione di ATP e la segnalazione di HIF1 (figura 9A). Per i cardiomiociti, invece, i processi arricchiti osservati sono legati alla matrice extracellulare (figura 9B). Ciò implica un possibile ruolo della carenza di fratassina in questi processi.



**Figura 9.** Analisi di arricchimento geni DE su cellule in cui è stata recuperata l'espressione di fratassina. (A) analisi di arricchimento geni DE in iNs corretti. (B) analisi di arricchimento geni DE in iCMs corretti.

Inoltre, grazie ad analisi IPA (*ingenuity pathways analysis*) è stato possibile creare dei diagrammi di rete con le connessioni più plausibili tra i diversi geni. Per gli iNs, i geni differenzialmente espressi più rilevanti includevano GPI, HK2, TPI1, ALDOA, ENO1, LDHA, PFKP E PKM coinvolti nella glicolisi e gluconeogenesi. Per i cardiomiociti, i geni più rilevanti appartenenti allo spazio extracellulare includevano GDF15, HMOX1 e HSPG2 (figura 10).



**Figura 10.** *Ingenuity pathway analysis* (IPA). (A) IPA di geni dai *pathways* più arricchiti in iNs corretti. (B) IPA di geni dai *pathways* più arricchiti in iCMs

## Conclusioni

Come precedentemente esposto, la diminuzione di fratassina è considerata la causa dell'atassia di Friedreich. Tuttavia, nonostante questa chiara correlazione tra la carenza della proteina e lo sviluppo della malattia, i meccanismi patogenetici, la sua variabilità e specificità d'organo non sono ancora del tutto compresi. Si è osservata una correlazione tra l'espansione delle ripetizioni GAA (associata ad alterazioni dell'eterocromatina e della metilazione del DNA) con l'età di insorgenza della malattia e la gravità del fenotipo. Ciononostante, il motivo per cui neuroni e tessuto cardiaco siano colpiti in modo preferenziali nonostante l'espressione ubiquitaria della proteina rimane ancora non chiaro. È inoltre non noto se la malattia porti a disfunzione in nervi e muscolo cardiaco per la stessa via o se siano coinvolte vie differenti.

Con questo lavoro, gli autori hanno cercato di esplorare ulteriormente i processi molecolari alla base della patologia, approfondendo le conseguenze della carenza di fratassina sull'espressione genica e le interazioni nelle cellule affette. Le cellule derivate da iPSC hanno permesso di ottenere alcune informazioni sulle iniziali perturbazioni dell'espressione genica associate alla carenza di fratassina. Nello specifico, il ripristino della proteina è risultato in un cambiamento dell'espressione genica di 127 geni nei neuroni derivati da iPSC, i quali sono coinvolti principalmente in glicolisi, generazione di ATP e via di HIF-1. Inoltre, è stato possibile osservare geni annotati per anomalie fenotipiche correlate alla FRDA, come disfunzioni sensoriali, debolezza muscolare e neuropatia periferica, quali NDRG1 (*N-myc downstream regulated 1*), PLOD1, DL3, HK1, HSPB8, SACS e MT-ATP6. Questi geni risultano "downregolati" nei neuroni FRDA, con l'eccezione di SACS e MT-ATP6 che risultano, invece, "upregolati". Questi geni sono risultati differenzialmente espressi anche nel confronto tra cellule FRDA e controllo. Inoltre, sono ritornati ai livelli normali di espressione nel momento in cui i neuroni sono stati integrati con fratassina.

I geni differenzialmente espressi nei *pathway* maggiormente arricchiti nei neuroni trasdotti erano GPI, HK2, TPI1, ALDOA, ENO1, LDHA, PFKP e PKM. È interessante notare che tutti questi risultano "downregolati" in iN FRDA.

In particolare, GPI codifica per un membro della famiglia delle proteine glucosio fosfato isomerasi ed agisce come enzima glicolitico nel citoplasma. Tuttavia, a livello extracellulare opera come fattore neurotrofico promuovendo la sopravvivenza dei neuroni motori e sensoriali, quelli maggiormente colpiti nell'atassia di Friedreich. Sebbene questo gene non sia stato associato alla FRDA, i suoi difetti sono associati ad una alterazione neurologica.

HK2 (esochinasi 2) è un enzima che coinvolto nella glicolisi. Inoltre, svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità della membrana mitocondriale esterna, impedendo il rilascio di proteina apoptogeniche dallo spazio intermembrana e la conseguente morte cellulare. La perdita del potenziale di



membrana mitocondriale e i difetti mitocondriali sono fenotipi osservati nelle cellule affette.

TPI1 codifica per un enzima metabolico coinvolto in glicolisi e gluconeogenesi. Una sua carenza può causare anemia, problemi di movimento, debolezza muscolare e maggiore suscettibilità alle infezioni. Gli altri geni, coinvolti nel metabolismo energetico e “downregolati” sono ALDOA, ENO1, LDHA, PFKP e PKM. In particolare, ENO1 può associarsi alla membrana mitocondriale esterna ed è essenziale per la sua stabilità ed una carenza di LDHA è stata associata a danno neuronale nella malattia di Alzheimer.

L’analisi IPA mostra come tutti questi geni siano collegati in una rete di segnalazione, dimostrando così la possibilità che fratassina sia coinvolta nella glicolisi e correlata ad altri geni associati a neuropatia nell’ataxia.

Studi precedenti a questo su iNs derivati da iPSC di FRDA hanno dimostrato livelli più bassi di ATP, diminuzione dell’attività dell’enzima aconitasi e riduzione del potenziale di membrana mitocondriale. Risultano, perciò, coerenti con i risultati ottenuti con questo studio.

Il ripristino di fratassina nei cardiomiociti ha portato a cambiamenti in 417 geni correlati a processi e componenti della matrice extracellulare. Le analisi dei *pathways* hanno indicato un arricchimento più significativo per la matrice extracellulare. In quanto il soggetto FRDA per questo studio presentava lievi sintomi cardiaci, è possibile che il coinvolgimento della componente cardiaca fosse in fase iniziale e non ancora progredito. In seguito alle diverse analisi, i geni espressi in modo differenziale potenzialmente rilevanti includono GDF15, HMOX1 e HSPG2, i quali sono risultati “upregolati” nei cardiomiociti FRDA.

In particolare, GDF15 codifica un ligando di TGF-beta (noto anche come citochina inibitoria dei macrofagi) e diversi studi hanno associato questo gene alla fibrosi cardiaca. Inoltre, GDF15 aumenta anche in risposta a disfunzione cellulare e mitocondriale: agisce come marcatore infiammatorio e partecipa alla patogenesi di malattie cardiovascolari, disturbi metabolici e processi neurodegenerativi. Questa correlazione suggerisce il GDF15 come possibile biomarcatore sierico per le malattie cardiache associate a FRDA.

HMOX1 codifica per l’enzima eme ossigenasi 1, il quale media la prima fase del catabolismo dell’eme. La sua “upregolazione” è stata implicata nell’aumento della ferroptosi nell’aterosclerosi diabetica. Anche la fratassina è coinvolta nella regolazione del ferro e nella sintesi dell’eme e la ferroptosi risulta uno dei meccanismi recentemente proposti nella FRDA.

Il gene HSPG2 codifica per il perlecano, un proteoglicano solfato presente nella matrice extracellulare. È stato dimostrato il suo coinvolgimento in diverse patologie associate al rimodellamento della matrice extracellulare, tra cui il diabete, malattie cardiovascolari e morbo di Alzheimer.

L’analisi IPA mostra come questi diversi geni siano collegati tra loro in una rete di segnalazione ad altri geni sempre differenzialmente espressi. Questo illustra la

possibilità di interazioni della fratassina nei cardiomiociti con conseguente rimodellamento della matrice extracellulare nella FRDA.

L'obiettivo dello studio era quello di valutare direttamente il ruolo della carenza di fratassina nelle cellule, indipendentemente dall'estensione dell'espansione GAA. È stato quindi possibile identificare alcune interazioni chiave all'interno del *network* di fratassina che potrebbero contribuire alla patogenesi della malattia.

Sembrano avere un ruolo essenziale, nell'aspetto neurologico della patologia, i geni coinvolti nella glicolisi, mentre i geni legati alla matrice extracellulare risultano fondamentali per lo sviluppo della malattia cardiaca. Si tratta, perciò, di un possibile spunto di riflessione sulla diversa suscettibilità e sui diversi effetti di neuroni e cardiomiociti. Cuore e neuroni differiscono in modo significativo per quanto riguarda le fonti di energia e la loro suscettibilità alla mancanza di nutrienti: in un cuore umano sano più del 95% dell'ATP prodotto proviene dalla fosforilazione ossidativa nei mitocondri, i cui substrati preferiti sono acidi grassi. Altre fonti di ATP per il miocardio sono l'ossidazione di glucosio, lattato, aminoacidi e corpi chetonici. La maggior parte delle patologie cardiache mostrano una ridotta produzione di energia da parte del miocardio, con uno spostamento verso una maggiore dipendenza dal glucosio.

Al contrario, i neuroni centrali si affidano quasi esclusivamente alla glicolisi con ossidazione completa dei prodotti glicolitici mediante fosforilazione ossidativa per la produzione di ATP. Pertanto, una perturbazione nell'espressione genica del *pathway* glicolitico nei neuroni FRDA potrebbe spiegare perché le prime manifestazioni sono solitamente neurologiche, mentre la comparsa della patologia cardiaca risulta più tardiva e variabile.

## **Limitazioni dello studio**

Nonostante le interessanti informazioni emerse da questo studio, è necessario considerare alcune limitazioni dello stesso.

Lo studio ha utilizzato le cellule derivate da un unico paziente malato: pochi geni e *pathways* si sovrappongono quando questo studio viene confrontato con altri studi di RNA-seq in cellule FRDA. Questo potrebbe riflettere sia l'utilizzo di diverse tecniche e protocolli per la generazione di neuroni e cardiomiociti da iPSC e per l'"upregolazione" di fratassina, ma soprattutto la possibile variabilità da paziente a paziente. Sarebbe, perciò, necessario ampliare lo studio ad un numero di pazienti più ampio per risolvere quali geni siano realmente associati alla malattia.

Inoltre, non è stato osservato alcun fenotipo fisiologicamente rilevante nelle cellule differenziate a partire da iPSC FRDA. Questo modello cellulare, quindi, non risulta utile per l'osservazione dei fenotipi FRDA di cardiomiociti e neuroni e pertanto, sarebbe necessario trovare nuove metodologie per far maturare le cellule derivate da iPSC da pazienti affetti in modo tale da generare fenotipi patologici corretti ed ottenere un quadro completo dello sviluppo dell'atassia di Friedreich.

## Bibliografia

- [1] Angulo, M. B., Bertalovitz, A., Argenziano, M. A., Yang, J., Patel, A., Zesiewicz, T., & McDonald, T. V. (2023). Frataxin deficiency alters gene expression in Friedreich ataxia derived iPSC-neurons and cardiomyocytes. *Molecular genetics & genomic medicine*, *11*(1), e2093. <https://doi.org/10.1002/mgg3.2093>
- [2] Pastore, A., & Puccio, H. (2013). Frataxin: a protein in search for a function. *Journal of neurochemistry*, *126* Suppl 1, 43–52. <https://doi.org/10.1111/jnc.12220>
- [3] Delatycki, M. B., & Bidichandani, S. I. (2019). Friedreich ataxia-pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiology of disease*, *132*, 104606.
- [4] Ayanlaja, A. A., Xiong, Y., Gao, Y., Ji, G., Tang, C., Abdikani Abdullah, Z., & Gao, D. (2017). Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility. *Frontiers in molecular neuroscience*, *10*, 199. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00199>
- [5] Sharma, A., Li, G., Rajarajan, K., Hamaguchi, R., Burridge, P. W., & Wu, S. M. (2015). Derivation of highly purified cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells using small molecule-modulated differentiation and subsequent glucose starvation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (97), 52628. <https://doi.org/10.3791/52628>
- [6] DeGiosio, R. A., Grubisha, M. J., MacDonald, M. L., McKinney, B. C., Camacho, C. J., & Sweet, R. A. (2022). More than a marker: Potential pathogenic functions of MAP2. *Frontiers in molecular neuroscience*, *15*, 974890.
- [7] Hein, S., Block, T., Zimmermann, R., Kostin, S., Scheffold, T., Kubin, T., Klövekorn, W. P., & Schaper, J. (2009). Deposition of nonsarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy or chronic pressure overload. *Experimental and clinical cardiology*, *14*(3), e68–e75
- [8] Adeola F. (2018). Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. *Ethiopian journal of health sciences*, *28*(6), 741–748. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i6.9>
- [9] [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=IT&Expert=95](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=IT&Expert=95)



## ORIGINAL ARTICLE

# Frataxin deficiency alters gene expression in Friedreich ataxia derived iPSC-neurons and cardiomyocytes

Mariana B. Angulo<sup>1,2</sup>  | Alexander Bertalovitz<sup>1,3</sup> | Mariana A. Argenziano<sup>1</sup> | Jiajia Yang<sup>1,2</sup> | Aarti Patel<sup>3</sup> | Theresa Zesiewicz<sup>4</sup> | Thomas V. McDonald<sup>1,2,3</sup> 

<sup>1</sup>Heart Institute, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida, USA

<sup>2</sup>Department of Molecular Pharmacology & Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida, USA

<sup>3</sup>Department of Medicine (Cardiology), Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida, USA

<sup>4</sup>Department of Neurology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida, USA

## Correspondence

Thomas V. McDonald, USF Heart Institute, 560 Channelside Drive, Tampa, FL 33602, USA.

Email: [thomasmcdonald@usf.edu](mailto:thomasmcdonald@usf.edu)

## Funding information

University of South Florida-Preeminence Fund

## Abstract

**Background:** Friedreich's ataxia (FRDA) is an autosomal recessive disease, whereby homozygous inheritance of an expanded GAA trinucleotide repeat expansion in the first intron of the *FXN* gene leads to transcriptional repression of the encoded protein frataxin. FRDA is a progressive neurodegenerative disorder, but the primary cause of death is heart disease which occurs in 60% of the patients. Several functions of frataxin have been proposed, but none of them fully explain why its deficiency causes the FRDA phenotypes nor why the most affected cell types are neurons and cardiomyocytes.

**Methods:** To investigate, we generated iPSC-derived neurons (iNs) and cardiomyocytes (iCMs) from an FRDA patient and upregulated *FXN* expression via lentivirus without altering genomic GAA repeats at the *FXN* locus.

**Results:** RNA-seq and differential gene expression enrichment analyses demonstrated that frataxin deficiency affected the expression of glycolytic pathway genes in neurons and extracellular matrix pathway genes in cardiomyocytes. Genes in these pathways were differentially expressed when compared to a control and restored to control levels when FRDA cells were supplemented with frataxin.

**Conclusions:** These results offer novel insight into specific roles of frataxin deficiency pathogenesis in neurons and cardiomyocytes.

## KEYWORDS

extracellular matrix, frataxin, Friedreich's ataxia, glycolysis, lentivirus

## 1 | INTRODUCTION

Friedreich's ataxia (FRDA) is an autosomal recessive neurodegenerative disease with a progressive course. Most cases are caused by a GAA trinucleotide repeat expansion (above 66 repeats in the first intron of the frataxin gene (*FXN*, OMIM:606829)), resulting in transcriptional repression of

frataxin (Campuzano et al., 1996; Campuzano et al., 1997; Cossee et al., 1997). FRDA is the most common inherited ataxia, with a prevalence of 1 in 50,000 Caucasians and a carrier frequency of 1:60 to 1:100 (Campuzano et al., 1996; Cossee et al., 1997; Delatycki et al., 2000). Neurological symptoms typically appear in the first decade of life due to sensory neuron degeneration in the dorsal root ganglia,

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals LLC.

the cerebellar, and the spinocerebellar tracts (De Biase et al., 2007; Koeppen & Mazurkiewicz, 2013). Neuronal degeneration leads to loss of balance and coordination, sensory loss, muscle weakness, and dysarthria (Koeppen & Mazurkiewicz, 2013).

FRDA is considered a multisystem disorder; however, that impacts the central and peripheral nervous systems, the musculoskeletal system, the heart, and the pancreas (Keita et al., 2022). Common musculoskeletal features include scoliosis, pes cavus, and talipes equinovarus. About half of the FRDA patients display glucose intolerance, and studies have found that diabetes mellitus is more prevalent in these patients, with estimates between 1% and 32% (Cnop et al., 2012; Finocchiaro et al., 1988; Gucev et al., 2009; Isaacs et al., 2016).

Approximately 60% of the patients with FRDA develop progressive cardiac disease that appears similar to primary hypertrophic cardiomyopathy (HCM) but is characterized by more progressive cardiac fibrosis, systolic dysfunction, and arrhythmias (Gunal et al., 1996; Harding & Hewer, 1983; Kawai et al., 2000). In most cases, the electrocardiogram (ECG) displays repolarization abnormalities that come in the form of T-wave inversion or flattening in lateral or inferior leads and ST-segment elevation or depression. Typical echocardiographic findings involve increased end-diastolic septal and posterior wall thicknesses and left ventricular hypertrophy. 20% of FRDA patients present reduced ejection fraction in the second to third decade of life, usually after the neurological disease is well established (Koeppen et al., 2015; Pousset et al., 2015). Cardiac involvement in FRDA patients is variable however and has been reported in some instances to precede neurological dysfunction, while in other cases, cardiac disease is never manifest (Hanson et al., 2019; Zesiewicz et al., 2020). This unpredictable discordance between neurological and cardiac disease onset suggests different pathophysiological mechanisms and cell-type susceptibility to GAA repeat expansion and frataxin deficiency.

There are multiple proposed functions of frataxin including involvement in iron homeostasis, cellular redox reaction regulation, iron–sulfur cluster biogenesis, and heme synthesis (Adamec et al., 2000; Adinolfi et al., 2009; Becker et al., 2002; Yoon & Cowan, 2003, 2004). However, none of them fully explain why its deficiency generates the various FRDA phenotypes. Among the possibilities are that frataxin may play different roles in neurons and cardiomyocytes and that the GAA expansion itself may have a pathological role independent of frataxin (Al-Mahdawi et al., 2008; Castaldo et al., 2008). It is also unclear why deficiency of ubiquitously expressed frataxin selectively affects neurons and myocardium (Koutnikova et al., 1997).

Presently, there is no approved effective therapy to prevent or reverse FRDA pathology (Aranca et al., 2016;

Zesiewicz et al., 2020). Therefore, generating reliable cellular models that recapitulate FRDA-related molecular processes is important for studying disease mechanisms, and identification of therapeutic targets and disease biomarkers (Hick et al., 2013). Cells derived from FRDA patients are a relevant cell model as they carry the complete *FXN* locus with the GAA expansion and regulatory sequences. Since intact neurons and cardiomyocytes are not routinely accessible from patients, the ability to differentiate human induced pluripotent stem cells (iPSCs) into iNs and iCMs to generate model systems derived from patient cells that closely mimic the disease is crucial for FRDA. Here, we generated iPSCs from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from an FRDA patient to study iNs and iCMs. Since FRDA is a progressive disease, taking years to manifest, by studying newly differentiated neurons and cardiomyocytes (with and without re-introducing frataxin), we biased towards early molecular processes in frataxin deficiency, independent of the GAA expansion. Our results suggest that frataxin absence may specifically affect glycolysis in neurons and the extracellular matrix in cardiomyocytes. These findings provide insights into possible pathological differences between the two tissues in FRDA.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Ethical compliance

Written informed consent was obtained from the patient. The study was approved by the Institutional Review Board of the University of South Florida (IRB: Pro00033948) and was conducted according to the Principles of the Declaration of Helsinki.

### 2.2 | Cell reprogramming and iPSC culture

We recruited a 34-year-old male with FRDA through the Friedreich Ataxia Neurology Clinic at the University of South Florida, Morsani College of Medicine. Clinical information about the subject is provided in Table 1. PBMCs from the FRDA subject were reprogrammed into iPSCs using the CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (A16517, Thermo Fisher). The iPSCs were cultured in mTESR plus medium (100–0276, STEMCELL Technologies) on Matrigel-coated plates (354277) and passaged every time they reached 60% confluency using EDTA 0.5 mM. They were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 85% relative humidity, and the medium was changed every other day. The control

TABLE 1 Patient clinical information

Gender	Age	Ethnicity	GAA expansion	First neurological symptom	Age of onset neurological symptom	Neurological status at enrollment	First cardiac symptom	Age of onset cardiac symptom	ECG	Other symptoms
Male	34 years	Caucasian	1092 & 781	Difficulty walking	8	Wheelchair-bound, slurred speech, lack of coordination, Balance problem	Chest pain	28	TWI	Scoliosis, kyphoscoliosis, Osteoarthritis of spine

Abbreviation: TWI, T wave inversions.

cell line was purchased from ATCC (ACS-1026, from a Caucasian male) and cultured as described above. The FRDA-iPSC characterization and validation of the pathogenic GAA trinucleotide were previously described (Angulo et al., 2021).

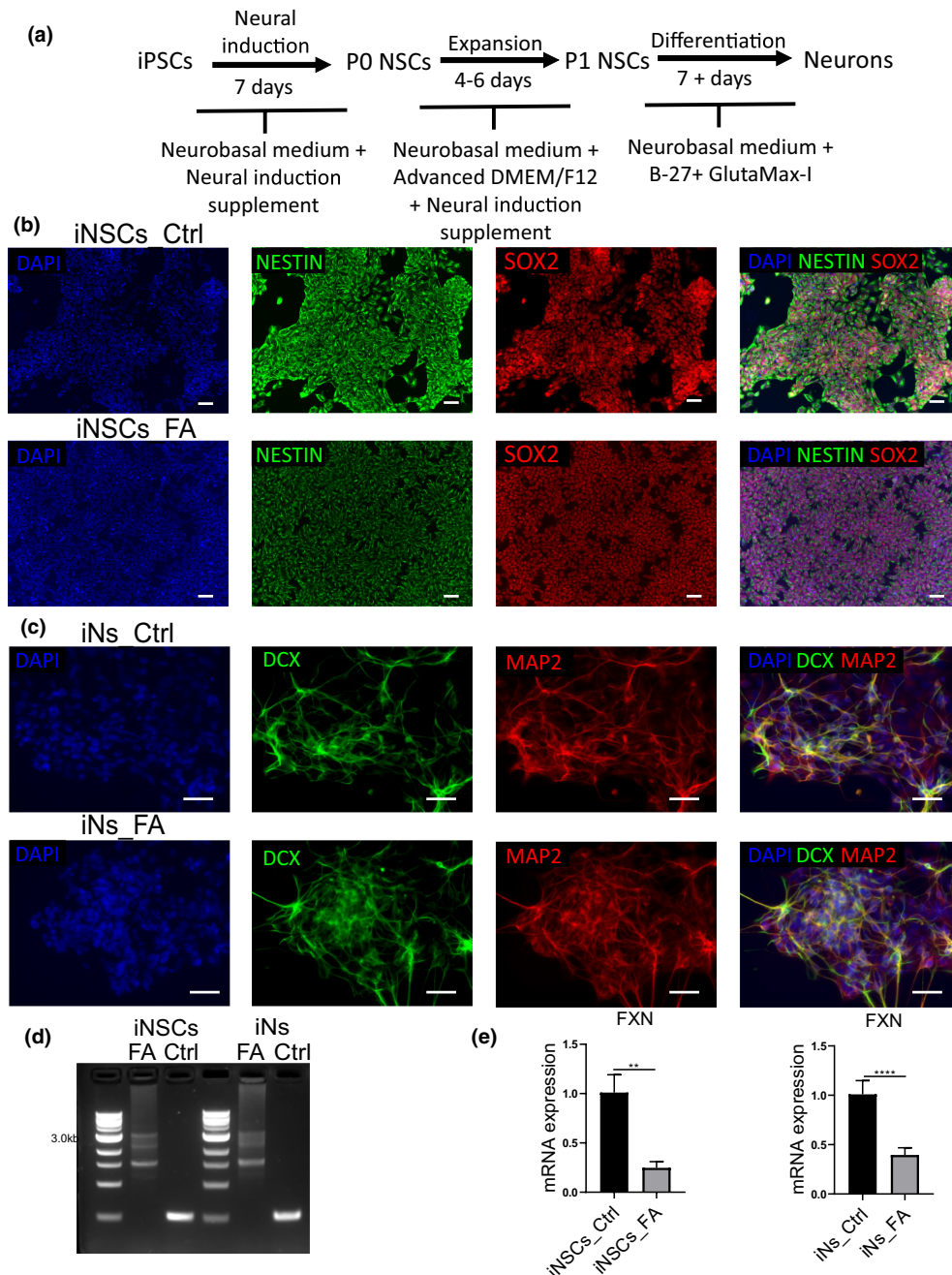
### 2.3 | Neuron differentiation

For neuron differentiation, we used a Gibco media system (Figure 1a). For neural induction, iPSCs were seeded to reach 15%–20% confluency on Matrigel-coated plates after 1 day of splitting them. mTESR plus medium was exchanged at this confluency for a pre-warmed neural induction medium (A1647801, Thermo Fisher). This medium was replaced every 2 days until day 7. By day-7, the iPSCs have differentiated into Neural Stem Cells (NSCs). NSCs were dissociated with StemPro Accutase (A1110501, Thermo Fisher), expanded using neural expansion medium (A1647801 + 12634010, Thermo Fisher), and characterized before further differentiation (Figure 1b–e). After expanding NSCs to passage 1, they were dissociated and seeded on Matrigel-coated plates with neural differentiation medium (A3653401, Thermo Fisher) to achieve neuron differentiation. This medium was replaced every 2 days. Neurons were observed 7 days after neuron media was added. Their characterization is shown in Figure 1c–e.

### 2.4 | Cardiomyocyte differentiation

iPSCs derived from the FRDA subject and control were differentiated into iCMs with the STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Kit (# 05010, STEMCELL Technologies) per manufacturer's protocol (Figure 2a). Briefly, iPSCs were seeded on Matrigel-coated plates with mTESR plus medium until they reached ~95% confluency. Then, the medium was changed to STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium A with matrigel (1:100) for 2 days, followed by STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium B for 2 days, and STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium C for 4 days. They were subsequently maintained in STEMdiff™ Cardiomyocyte Maintenance Medium, and the medium was changed every other day. iCMs were purified with a metabolic-selection method using glucose starvation (RPMI-glucose + B27) (11879020, 17504044, Thermo Fisher) for 5 days as previously described (PMID: 25867738). For downstream experiments, iCMs were dissociated with cardiomyocyte dissociation media (# 05025, STEMCELL Technologies). iCM characterization is shown in Figure 2b–d.





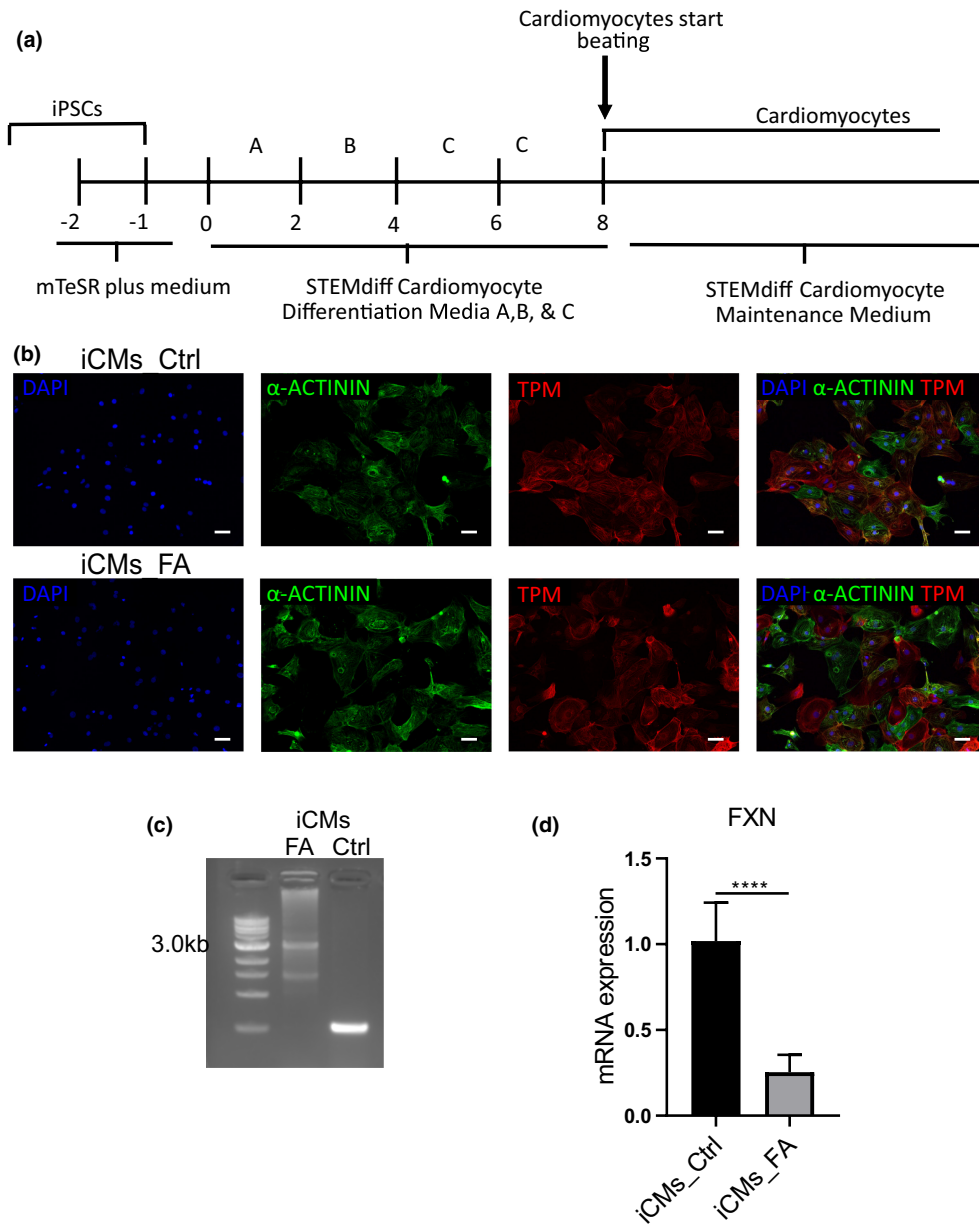
**FIGURE 1** iNSCs and iNs characterization. (a) Protocol diagram for neuron differentiation. (b) Immunostaining of control and patient iPSC-derived neural stem cells (iNSCs) showed expression of the markers NESTIN (green) and SOX2 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar 50  $\mu$ m. (c) Immunostaining of control and patient iNs showing expression of neuron markers of DCX (green) and MAP2 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar 50  $\mu$ m. (d) PCR analysis of the GAA repeat region in the *FXN* gene using genomic DNA extracted from iNSCs and iNs from control and FRDA patient. (e) qPCR quantification of *FXN* mRNA levels in iNSCs and iNs from control and FRDA patient. Data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.05. \*FA means FRDA.

## 2.5 | Immunofluorescence analysis

Cells were fixed in 4% PFA (28,908, Thermo Fisher) for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.2% Triton X-100 (T8787, Sigma Aldrich) for 10 min, and

blocked for 30 min with 1% of BSA (Sigma-Aldrich) with 22.52 mg/ml glycine (BP381-500, Fisher Scientific) in PBST (phosphate-buffered saline with 0.1% Tween 20). For staining, antibodies were diluted in 1% BSA in PBST. Samples were incubated overnight at 4°C with





**FIGURE 2** iCMs characterization. (a) Protocol diagram for cardiomyocyte differentiation. (b) Immunostaining of control and patient iCMs showing expression markers  $\alpha$ -actinin (green) and tropomyosin (TPM) (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar 50  $\mu$ m. (c) PCR analysis of the GAA repeat region in the *FXN* gene using genomic DNA extracted from iCMs from control and patient. (d) qPCR quantification of *FXN* mRNA levels in iCMs from control and FRDA patient. Data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . \*FA means FRDA.

primary antibodies. Cells were washed three times with cold PBS and incubated at room temperature for 1 h with secondary antibodies. Then they were washed three times with cold PBS, counterstained with NucBlue Reagent DAPI (R37606, Thermo Fisher), and mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant (P36961, Thermo Fisher). Samples were imaged with a Keyence BZ-X800 fluorescence microscope and analyzed using Image J. Primary, and secondary antibodies are listed in Table S1.

## 2.6 | GAA repeat analysis

Genomic DNA from cells was isolated using the QIAamp DNA Mini and Blood Mini kit (51104, Qiagen). DNA concentration and purity were determined with the Cytation 5 reader (Agilent Technologies).

Amplification of GAA repeat expansions in the *FXN* gene was performed by PCR using primers GAA\_F: 5'-GGCTTGAACCTCCACACGTGTT and GAA\_R: 5'-AGGACCATCATGGCCCACTT, as previously described

(Long et al., 2017). Reactions utilized the Failsafe PCR System with mix D (FS99100). The thermal cycler was programmed as follows: 94°C for 3 min, 20 cycles of 94°C for 20s, 64°C for 30s, and 68°C for 5 min, followed by 9 cycles of 94°C for 20s, and 68° for 5 min, each subsequent elongation step increased by 15s. The last step was 68°C for 7 min. The amplification products were resolved on 1% agarose gels stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (cat. S33102, Thermo Fisher). The length of an expanded GAA repeat was determined using the base pair size called function, of Image Lab 6.0 (BioRad). The GAA length was calculated by subtracting the length of the PCR primers and GAA flanking sequences from the number of base pairs of the PCR product and dividing the difference by three. [Number of GAA repeats = (length of base pairs of a PCR product–498)/3]The reference sequence used is NG\_008845.2.

## 2.7 | Reverse transcription and qPCR

Cells were lysed using buffer RLT (Q79216, Qiagen) and homogenized with QiaShredder (79656, Qiagen). RNA was extracted with the RNAeasy Mini Kit (74194, Qiagen). For the reverse transcription, 2 µg of RNA were mixed with 4ul of Superscript IV VILO Master Mix (# 11755050, Thermo Fisher) and DEPC water to 20µl. Samples were incubated for 10 min at 25°C, then for another 10 min at 50°C, and 5 min at 85°C. The resulting cDNA was used for qPCR.

For qPCR, cDNA was amplified on the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems, 4376600) using TaqMan Fast Advanced Master Mix (# A44360, Thermo Fisher) and Taqman Gene expression probes *FXN* (# Hs01075496\_m1), *GAPDH* (# Hs02786624\_g1). The expression of mRNAs was normalized to the expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA. Data were analyzed using the comparative Ct method (Livak & Schmittgen, 2001).

## 2.8 | Frataxin lentivirus transfer plasmid generation

The pcDNA3.1-hFrataxin-HA plasmid (31895) was obtained from Addgene. The following primers (forward) 5'-GCTCGCTAGCGCCACCATGTGGACTCTCGGGCG-3' and (reverse) 5'-GCCCGGATCCTCAAGCATCTTTTCCGGAATAGGCC-3' were synthesized (Sigma-Aldrich) and used to generate a frataxin-containing PCR product (without Human influenza hemagglutinin [HA]-tag) flanked by NHEI (5' end) and BAMHI (3' end) restrictive sites. This PCR product was digested with restriction

endonucleases NHEI and BAMHI and gel purified with the DNA Gel Extraction Kit (T1020S, NEB). The Lentiviral NanoLuc control expression vector plasmid (113450, Addgene) was obtained from Addgene and gel purified using the Monarch® DNA Gel Extraction Kit (T1020S, NEB) after being digested with restriction endonucleases NHEI and BAMHI to remove both the NanoLuc insert and the amino-terminal MYC epitope tag. T4 ligase was used to conjugate the gel-purified insert into the gel-purified backbone of the plasmid (Figure 3a). Final expression plasmids were verified by Sanger Sequencing (Eurofins Genomics).

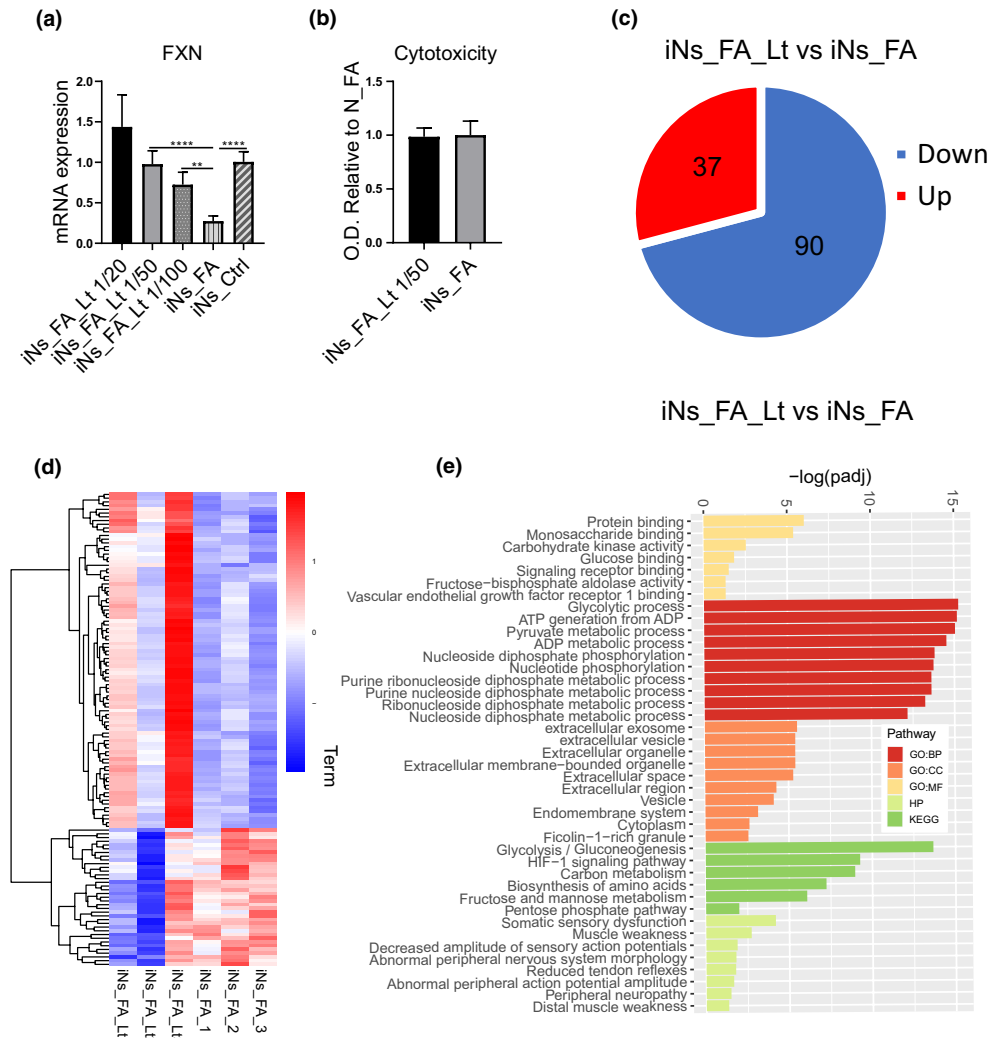
## 2.9 | Frataxin lentivirus production

HEK293T cells were plated in Poly-d-lysine (A3890401, Thermo Fisher) coated 60mm dishes in 5 ml media without antibiotics (RPMI-1640 supplemented with FBS, 11875093 and 16140, Thermo Fisher) so that the next day the confluency was around 70%. The day after plating, cells were transfected using the Lipofectamine 3000 transfection reagent (L3000001, Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. 1.25 µg of envelope plasmid pCMV-VSV-G (8454, Addgene), 1.25 µg of packaging plasmid psPAX2 (12260, Addgene), and 2.5 µg of frataxin lentivirus transfer plasmid were used for transfection. The day after transfection, the media was replaced with 5 ml of media with antibiotics (15070063, Thermo Fisher). Two days later, the media (containing lentivirus) was collected and filtered through a 0.45 µm filter (25–245, Genesee Scientific) and stored at 4°C. 5 ml of new media with antibiotics was added to the transfected cells. Two days later, the media was collected and filtered through a 0.45 µm filter and mixed with previously collected media. Samples were aliquoted and frozen at –80°C until further analysis and transduction.

## 2.10 | Frataxin lentivirus titer and transduction

To determine the lentivirus titer, we used the Lenti-X GoStix Plus (631280 Takara), following the manufacturer's recommendations. Briefly, the GoStix Plus app was downloaded on a mobile device, and the lot number of the kit was entered. Since our lentivirus sample was unconcentrated, we tested the sample undiluted and in a 1:2 dilution to ensure a reading within the standard curve range. Following the prompts within the app, 20µl of the lentiviral supernatant (diluted and undiluted) were applied to the Lenti-X GoStix Plus cassette





**FIGURE 4** Frataxin lentivirus transduction in FRDA iNs and RNA-seq analysis. (a) qPCR quantification of *FXN* mRNA levels of transduced FRDA iNs with different lentivirus dilutions to determine the optimal concentration for transduction (1/50 dilution equivalent to 5.4 ng/ml of p24). Data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . (b) Cytotoxicity assay to determine if the chosen concentration for transduction was toxic to iNs. Data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . (c) Venn diagram illustrating the differentially expressed genes between transduced and non-transduced FRDA iNs. (d) a heatmap illustrating the expression of 127 genes DE in both groups (transduced and non-transduced FRDA iNs). Three independent replicates are shown per group (e) enrichment analysis of DE genes in transduced and non-transduced iNs using g:Profiler. We included results from the gene ontology, KEGG, and human phenotype ontology databases. \*FA means FRDA.

## 2.11 | Cytotoxicity assay

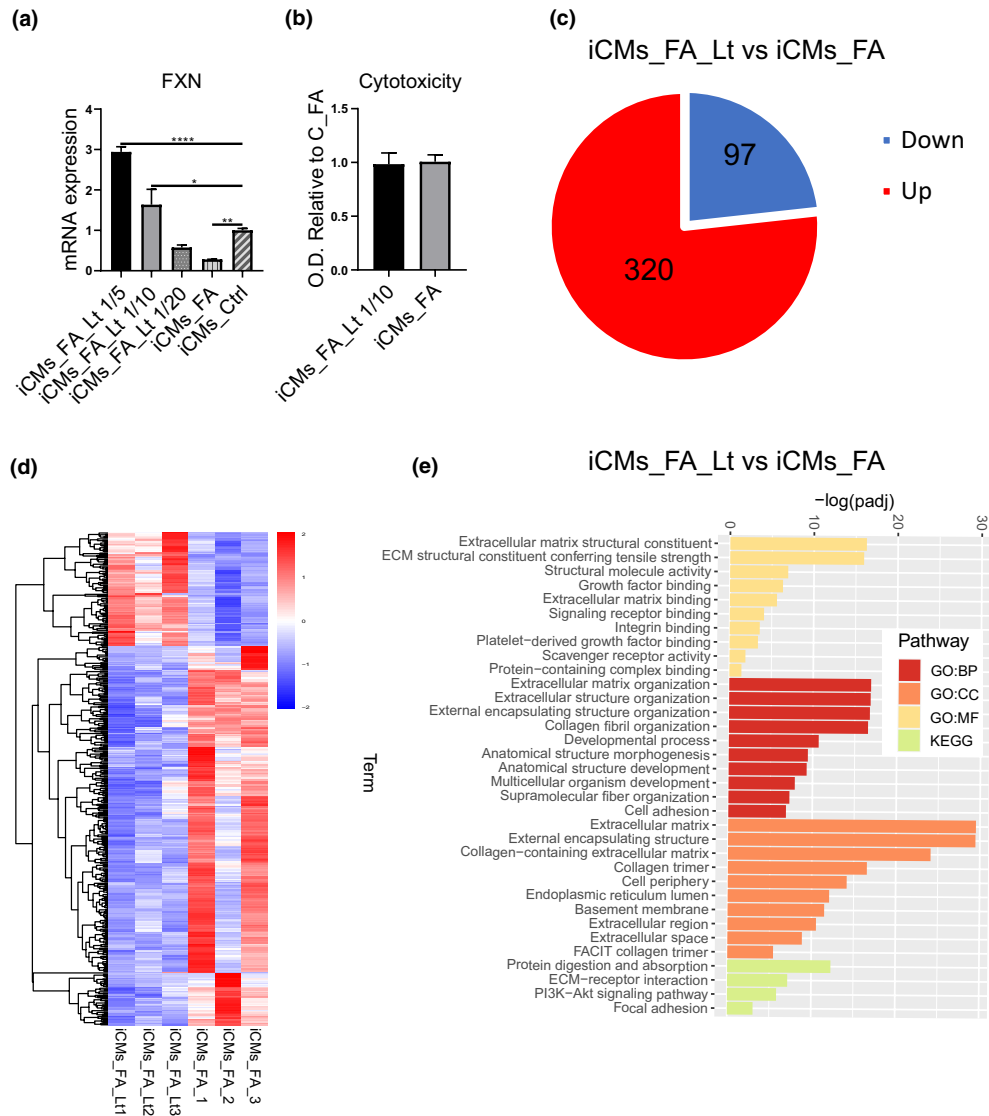
To determine whether forced expression of frataxin resulted in cell toxicity we used the Cell Counting Kit-8 (CCK8) (9692, Sigma-Aldrich). 5000 cells/well (iNs and iCMs) were seeded in a 96-well plate. Cells were transduced with frataxin lentivirus, and 2 weeks later, the cytotoxicity assay was performed. 10  $\mu$ l of the CCK8 solution was added to each well of the plate containing transduced, non-transduced cells, and control without cells. After 2 h of incubation at 37°C, the absorbance was measured at 450 nm using the Cytation 5 reader (Agilent Technologies). This assay was repeated three

times, using a minimum of 6 wells per condition each time.

## 2.12 | Capillary western blot

Cells were lysed using RIPA buffer (89900, Thermo Fisher) with protease and phosphatase inhibitors (78430, Thermo Fisher). Lysates were sonicated and centrifuged for 15 min at 15,000 rpm. Protein concentration was determined with a Bradford assay (23236, Thermo Fisher). Capillary western analyses were performed using the ProteinSimple Wes<sup>®</sup> System. Samples were diluted with 0.1 $\times$  Sample





**FIGURE 5** Frataxin lentivirus transduction in FRDA iCMs and RNA-seq analysis. (a) qPCR quantification of *FXN* mRNA levels of transduced FRDA iCMs with different lentivirus dilutions to determine the optimal concentration for transduction (1/10 dilution equivalent to 27 ng/ml of p24). Data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . (b) Cytotoxicity assay to determine if the chosen concentration for transduction was toxic to iCMs. Data are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . (c) Venn diagram illustrating the DE genes between transduced and non-transduced FRDA iCMs. (d) a heatmap illustrating the expression of 417 genes DE in both groups (transduced and non-transduced FRDA iCMs). Three independent replicates are shown per group (e) enrichment analysis of DE genes in transduced and non-transduced iCMs using g:Profiler. We included results from the gene ontology and KEGG databases. \*FA means FRDA.

Buffer. Then four parts of the diluted sample were combined with 1 part of 5 $\times$  Fluorescent Master Mix (which contains 5 $\times$  sample buffer, 5 $\times$  fluorescent standard, and 200 mM DTT) and incubated at 95°C for 5 min. After that, the samples, blocking reagent, primary, HRP-conjugated secondary antibodies, and chemiluminescent substrate were dispensed into assigned wells in a 13-well assay plate. After plate loading, the separation electrophoresis and immunodetection steps occurred in the fully automated capillary system (Protein Simple). Primary and secondary antibodies are listed in [Table S1](#).

### 2.13 | RNA-SEQ, differential expression analysis, and enrichment analysis

RNA was isolated as described in the reverse transcription and qPCR method section. The concentration and purity of the RNA were determined with the Cytation 5 reader (Agilent Technologies). RNA from 3 biological replicates of each study group were sequenced at Novogene Co. Ltd for RNA-Seq and differential expression analysis. Briefly, 1  $\mu$ g RNA per sample was used as input material for the RNA sample preparations. Sequencing libraries

were generated using NEBNext® Ultra II TM RNA Library Prep Kit for Illumina® (E7770S, NEB) following the manufacturer's instructions, and index codes were included to assign sequences to each sample. Library quality was evaluated on the Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies). Clustering the index-coded samples was performed on a cBot Cluster Generation System using PE Cluster Kit cBot-HS (PE-401-3001, Illumina). After cluster generation, the library preparations were sequenced on an Illumina platform, and paired-end reads were produced. Raw data reads of FASTQ format were processed with fastp.

Clean reads were obtained by removing reads containing adapter and poly-N sequences and low-quality reads. Q20, Q30, and GC content of the clean data were calculated. These clean reads were used for all downstream analyses. The reference genome and gene model annotation files were downloaded from genome website browser (NCBI/UCSC/Ensembl). Paired-end clean reads were aligned to the reference genome using the Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) software, and FeatureCounts was used to count the read numbers mapped of each gene. RPKM of each gene was calculated based on the length of the gene and read counts mapped to this gene. Differential expression analysis (DEA) was performed using the DESeq2 R package. The resulting *p* values were adjusted using Benjamini and Hochberg's approach to control the False Discovery Rate (FDR). Genes with an adjusted *p* < 0.05 found by DESeq2 were assigned as differentially expressed (DE). For enrichment analysis, the DE genes were submitted to g:Profiler, a web server that interprets and maps genes to the corresponding enriched pathways based on well-established data sources. We included Gene ontology, which annotates genes to biological processes, molecular functions, and cellular components; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), which annotates genes to pathways; and Human Phenotype Ontology which provides human disease phenotype associations. Finally, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Qiagen) was used to visualize the significant networks of the most enriched pathways.

## 2.14 | Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation (SD) as indicated. Statistical significance was determined by Student's *t* test (two-tailed) for two groups and one-way ANOVA for multiple groups with post hoc test Bonferroni. Statistical significance was defined as a value of *p* < 0.05.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Generation of neurons and cardiomyocytes from FRDA and control iPSCs

To study the most relevant cells affected in FRDA, we generated iNs and iCMs from iPSCs derived from a FRDA subject and an unrelated control. The patient is a 34-year-old Caucasian male presenting a GAA expansion of 1092 and 781 repeats in the intron 1 of *FXN* (NG\_008845.2:g.6725GAA[(781–1092)]). He was first diagnosed with FRDA at 8-years of age due to walking difficulties. His first cardiac symptom manifested at the age of 28 with chest palpitations. At the time of enrollment in this study, he was a wheelchair user and presented several neurological, cardiac, and other symptoms typical of FRDA, summarized in Table 1. iPSCs from a control subject were purchased from the ATCC company, who was a 31-year-old Caucasian male at the time of PBMC donation. These cells have <10 GAA repeats in the *FXN* gene (Angulo et al., 2021). To differentiate the iPSCs into neurons, they were first induced into Neural Stem Cells (Figure 1a). These cells were expanded and characterized before the final differentiation into neurons. NSCs from both FRDA subject and control express the NSC markers Nestin and Sox2 (Figure 1b) and continue to divide. The GAA expansion is preserved in the FRDA subject's NSCs (Figure 1d). *FXN* mRNA level as assayed with RT-PCR demonstrates NSCs from the FRDA subject exhibited markedly reduced *FXN* than control NSCs (Figure 1e), corresponding to FRDA pathogenesis. Neuron differentiation started when NSCs were in passage 1, and fully differentiated neurons were observed at day 7 (Figure 1a). These cells expressed neuronal markers DCX and MAP2 and displayed the typical neuronal morphology of rounded cells with elongated processes connecting them (Figure 1c). The FRDA subject's neurons also preserved the GAA expansion and had significantly lower levels of *FXN* compared to those derived from the control (Figure 1d,e). iPSCs from FRDA subject and control were differentiated into iCMs and purified as described in methods until further analysis. These iCMs expressed cardiac markers  $\alpha$ -actinin and Tropomyosin and exhibited spontaneous contractions (Figure 2b). The FRDA iCMs maintained the GAA expansion and expressed lower levels of *FXN* than control CMs (Figure 2c,d).

### 3.2 | Forced expression of frataxin in iPSC-derived neurons and cardiomyocytes

To study the role of frataxin deficiency in iPSC-derived iNs and iCMs from the FRDA-subject, we sought to restore its

expression level by transducing them with frataxin lentivirus (Figure 3a). Prior studies have found that high levels of frataxin can be toxic to cells (PMID: 29794127) (Belbellaa et al., 2020; Huichalaf et al., 2022; Vannocci et al., 2018). Therefore, we modified a transfer plasmid with a weak constitutive promoter (UbC) (113,450, Addgene) (Qin et al., 2010) to better control frataxin overexpression (Figure 3a). To test this frataxin lentivirus, we first transduced iPSC-derived iNs and iCMs from control. We harvested the cells for analysis 2 weeks post-transduction to ensure that *FXN* overexpression was not an early transient event. To evaluate the mRNA level of *FXN*, we performed RT-PCR and obtained a more than 10-fold increase in transduced Ns and CMs compared to non-transduced cells (Figure 3b). We also determined that the *FXN* mRNA was being translated into protein. Capillary western blot demonstrated an increased frataxin protein in both iNs and iCMs (Figure 3c). To verify that the overexpression of *FXN* was evenly distributed among the cells, we performed immunofluorescence staining of frataxin, co-stained with a neuron or cardiac marker (DCX and cTnT, respectively) on transduced and non-transduced iNs and iCMs. Staining showed that frataxin is overexpressed broadly in transduced iNs and iCMs (Figure 3d,e). Therefore, we concluded that transduction with this frataxin lentivirus is suitable to overexpress frataxin in iPSC-derived iNs and iCMs and can be used to complement the frataxin level in FRDA cells.

### 3.3 | Determination of frataxin lentivirus titer and optimal concentration to transduce patient's iNs and iCMs

Prior studies have shown evidence that restoring the levels of frataxin to normal levels improves phenotypes of FRDA (Chandran et al., 2017; Lim et al., 2007; Sacca et al., 2011). Prior to examining if our introduction of *FXN*-lentivirus could achieve corrective changes we ascertained that our frataxin overexpression method would result in frataxin levels in FRDA-iPSCs as close as possible to control levels. To maintain reproducibility in all the experiments, we determined the lentivirus titer using an assay quantifies the amount of p24 capsid protein present in lentiviral supernatants, which correlates directly with infectious viral titer. We obtained 270 ng/ml of p24 for the frataxin lentivirus. Then we transduced the FRDA subject iNs and iCMs with different dilutions and measured the frataxin expression with RT-PCR relative to control cells to optimize the desired amount for transduction (Figures 4a and 5a). We chose a lentivirus dilution of 1/50 (5.4 ng/ml of p24) to transduce the FRDA iNs and 1/10 (27 ng/ml of p24) to transduce the FRDA iCMs. A cytotoxicity assay

was performed to determine that this chosen amount was not toxic to iNs and iCMs. We did not observe any difference in the number of living cells between transduced and non-transduced iNs and iCMs (Figures 4b and 5b).

### 3.4 | Transcriptome profiling identifies differentially expressed genes in frataxin transduced and FRDA iPSC-derived neurons and cardiomyocytes

To identify gene expression patterns for FRDA and specifically which genes are regulated solely by frataxin levels in iNs and iCMs, we performed transcriptional profiling using RNA-seq in frataxin transduced and non-transduced cells derived from the FRDA patient. For transduced cells, RNA from 3 biological replicates was collected 2 weeks after transduction when iNs and iCMs were 30-days old (from time of differentiation). For non-transduced cells, the RNA from 3 replicates was collected on the same day, when they were 30-days old. Differential expression analysis between FRDA transduced and non-transduced cells was performed, and the genes with an adjusted  $p < 0.05$  were assigned as DE. 127 genes were DE between transduced and non-transduced FRDA-derived iNs, of which 37 were upregulated, and 90 were downregulated (Figure 4c, and Table S2). For iCMs, 417 genes were DE, 320 were upregulated with lentivirus transduction, and 97 were downregulated (Figure 5c, and Table S3). Heatmaps representing the differentially expressed genes showing the 3 replicates are shown in Figures 4d and 5d.

### 3.5 | Functional enrichment analysis of differentially expressed genes of FRDA iPSC-derived neurons and cardiomyocytes

To elucidate the potential biological function of the DE genes of iNs and iCMs derived from the FRDA subject, we performed functional enrichment analysis. The top overrepresented biological processes and pathways for iPSC-derived iNs and iCMs from the patient are shown in Figures 4e and 5e. For iPSC-derived iNs, the most significant processes were related to carbohydrate metabolism, such as Glycolysis (GO:0006096), ATP generation (GO:0006757), and ADP and Pyruvate metabolic processes (GO:0046031, GO:0006090). According to previous studies, FRDA patients have abnormal glucose metabolism and exhibit a higher risk for diabetes (Finocchiaro et al., 1988; Gucev et al., 2009; Isaacs et al., 2016; Worth et al., 2015). Additionally, lower levels of ATP that are restored with increased frataxin levels have been shown in FRDA patients and models of FRDA (Bolinches-Amoros et al., 2014;

Heidari et al., 2009; Li et al., 2015; Lodi et al., 1999). Regarding the biological pathways based on the KEGG database, Glycolysis and Gluconeogenesis (KEGG:00010) is the most significant, but HIF-1 (KEGG:04066) and Carbon metabolism (KEGG:01200) are also enriched among other related pathways. Finally, from human phenotype ontology which annotates genes to phenotypic abnormalities encountered in human disease, we obtained features of FRDA such as sensory dysfunction (HP:0003474), muscle weakness (HP:0001324), and peripheral neuropathy (HP:0009830).

From iPSC-derived iCMs, the most significantly enriched terms were related to the processes and components of the extracellular matrix, such as extracellular matrix organization (GO:0030198) and collagen fibril organization (GO:0030199). Cardiac Fibrosis, which is the consequence of extracellular matrix remodeling from pathological processes, has been observed in FRDA patients even before overt cardiac disease has developed (Hanson et al., 2019). There is also enrichment for extracellular matrix pathways, including extracellular matrix-receptor interaction (KEGG:04512) and focal adhesion (KEGG:04510).

### 3.6 | Differentially expressed genes in FRDA vs. control iPSC-derived neurons and cardiomyocytes rescued with forced frataxin expression

To further understand the role of frataxin deficiency in FRDA, we investigated the DE genes of FRDA vs. control that are restored to control levels when patient cells are transduced with frataxin. To test this, we performed RNA-seq and DEA of FRDA iPSC-iNs and iCMs compared to control iPSC-derived cells. We analyzed for the FRDA genes that were corrected to control transcription levels after frataxin lentivirus transduction. The heatmaps showing the corrected genes for both iNs and iCMs are shown in Figures 6 and 7a (Tables S2 and S3). Then, we performed functional enrichment analysis using these corrected genes to determine the overrepresented biological pathways and processes. The most significant enriched processes and pathways for iPSC-iNs are Glycolysis (KEGG:00010, GO:0006096), ATP generation (GO:0006757), and HIF-1 signaling (KEGG:04066). These were overrepresented in our previous analysis of FRDA vs. frataxin-transduced FRDA, which implicates frataxin level directly into these pathways and processes.

Similarly, for iPSC-iCMs, the enriched processes in these corrected genes are related to the extracellular matrix like in the previous analysis. This means that the frataxin deficiency is likely playing a role in these processes. IPA from the most enriched pathways for the corrected genes

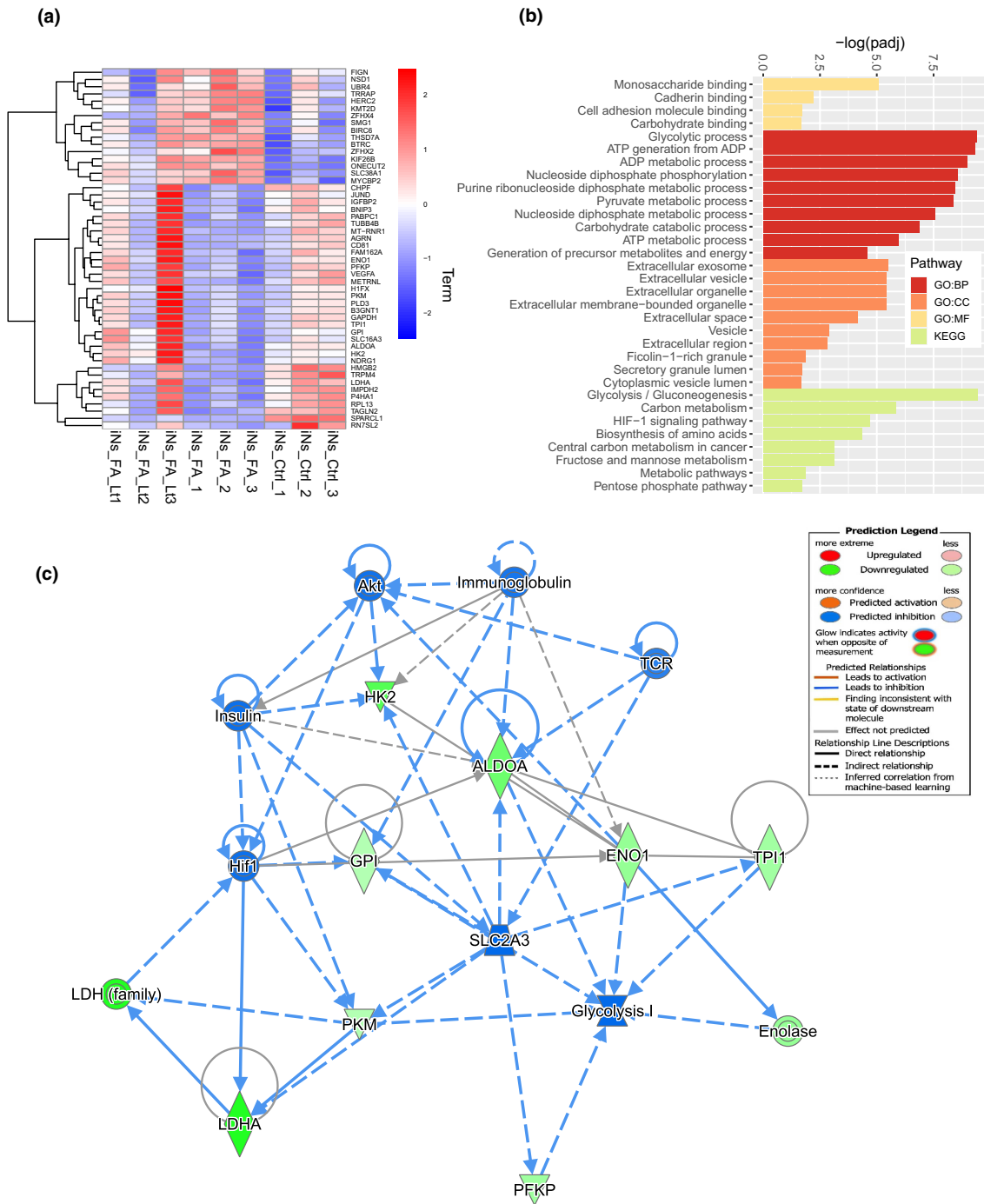
in iNs and iCMs shows network diagrams with the most plausible connections to each other and genes in the IPA knowledge base (Figures 6c and 7c). For iNs, the most relevant DE genes belonging to glycolysis and gluconeogenesis included *GPI* (OMIM:172400), *HK2* (OMIM: 601125), *TPI1* (OMIM:190450), *ALDOA* (OMIM: 103850), *ENO1* (OMIM: 172430), *LDHA* (OMIM: 150000), *PFKP* (OMIM: 171840), and *PKM* (OMIM: 179050). The most relevant DE genes belonging to extracellular space in iCMs are *GDF15* (OMIM: 605312), *HMOX1* (OMIM: 141250), and *HSPG2* (OMIM: 142461).

## 4 | DISCUSSION

It is generally accepted that the loss of frataxin expression is the cause of FRDA, although there remain several unresolved questions. Despite agreement on the correlation of frataxin deficiency with FRDA, the mechanisms of disease pathogenesis, variability, and organ specificity are still not fully understood (Cook & Giunti, 2017; Delatycki & Bidichandani, 2019; Zesiewicz et al., 2020). GAA repeat expansion in FRDA is associated with altered heterochromatin and DNA methylation that correlates with the extent of the expansion, phenotype severity, and age of disease onset, possibly independent of frataxin deficiency (Al-Mahdawi et al., 2008; Castaldo et al., 2008), however study of these effects has been largely restricted to the vicinity of the *FXN* locus. Why neurons and cardiac tissue are preferentially affected in FRDA despite the ubiquitous expression of frataxin has not been resolved. Whether FRDA leads to dysfunction in nerve and heart muscle by the same or different routes is also uncertain. Here, we sought to further explore disease molecular processes by studying gene expression consequences of frataxin deficiency and interactions in relevant affected cells. Therefore, we performed transcription analysis to investigate the *FXN* network in iPSC-derived iNs and iCMs from an FRDA patient. iPSC-derived cells provide information on the early gene expression perturbations associated with frataxin-deficiency.

Restoring frataxin was associated with a change in the expression of 127 genes in iNs, primarily related to processes and pathways involved in Glycolysis, ATP generation, and HIF-1. We also found genes annotated to phenotypic abnormalities related to FRDA, such as sensory dysfunction, muscle weakness, and peripheral neuropathy such as *NDRG1*, *PLOD1*, *PLD3*, *HK1*, *HSPB8*, *SACS*, and *MT-ATP6* (Figure 4e). These genes are downregulated in the FRDA iNs (except *SACS* and *MT-ATP6* that are upregulated). Genes belonging to these processes and pathways were also differentially expressed when FRDA cells were compared to an unrelated control. Furthermore, they were restored to control levels when FRDA-derived





**FIGURE 6** Differentially expressed genes in FRDA vs. control iNs corrected by frataxin transduction. (a) Heatmap illustrating the expression of DE genes in FRDA and control iNs that are restored to control level when transduced with FXN lentivirus. Three independent replicates are shown per group. (b) Enrichment analysis of corrected genes using g:Profiler. We included results from the gene ontology and KEGG databases. (c) Ingenuity pathway analysis (IPA) of the genes from the most enriched pathway of corrected iNs (glycolysis/gluconeogenesis). IPA generated a network diagram with the most probable connections to each other and to additional genes in the IPA knowledge base. \*FA means FRDA.

iNs were supplemented with frataxin. The differentially expressed genes from the most enriched pathways in corrected iNs were *GPI*, *HK2*, *TPI1*, *ALDOA*, *ENO1*, *LDHA*, *PFKP*, and *PKM* (Figure 6b). Interestingly all these genes were downregulated in FRDA-derived iNs.

*GPI* encodes for a member of the glucose phosphate isomerase protein family. This protein performs distinct functions; it acts as a glycolytic enzyme in the cytoplasm. However, extracellularly, it operates as a neurotrophic factor promoting survival of motor and sensory neurons'



et al., 2008). Loss of mitochondrial membrane potential and mitochondrial defects are phenotypes observed in FRDA cells and is a sign of bioenergetic stress (Codazzi et al., 2016; Hick et al., 2013; Lee et al., 2016). *TPII* encodes a metabolic enzyme important in glycolysis and gluconeogenesis. Deficiency of this enzyme causes anemia, movement problems, increased susceptibility to infection, and muscle weakness (Orosz et al., 2006).

Other downregulated genes that are part of energy metabolism include *ALDOA*, *ENO1*, *LDHA*, *PFKP*, and *PKM*. Cells with high energy demands, such as nerve cells and heart muscle cells, are susceptible to cell death due to reduced energy caused by impaired glycolysis, and these are the most affected cells in FRDA. *ENO1* can associate with mitochondrial membrane, and it is essential for membrane stability (Didiasova et al., 2019). *LDHA* deficiency is associated with neuronal damage in Alzheimer's Disease (Zhang et al., 2018). The IPA shows how these genes are connected in a signaling network (Figure 6c), demonstrating the possibility that frataxin is involved in glycolysis and other neuropathy-associated genes in FRDA.

Previous studies in iPSC-derived iNs from FRDA have shown lower ATP levels, decreased aconitase activity, and reduced mitochondrial membrane potential (Codazzi et al., 2016; Hick et al., 2013; Li et al., 2015). Therefore, these phenotypes are consistent with our findings. Interestingly, when compared to another transcriptional profile study in FRDA iPSC-derived iNs, the only shared process is the one related to extracellular matrix (Lai et al., 2019). This discrepancy could reflect the variability between patients, controls, and techniques to over-express frataxin. In the study by Lai et al, a combination of HDAC inhibition and gene editing was used with iNs. These methods focused on the GAA expansion instead of just correcting the *FXN* level.

Restoring frataxin in iCMs led to changes in 417 genes, which are related to processes and components of the extracellular matrix. Pathways analyses indicated that the most significant enrichment is for the extracellular matrix (Figure 5e). Our FRDA subject had mild cardiac symptoms, suggesting that cardiac involvement was in its early phase.

Genes differentially expressed in a frataxin-dependent manner in FRDA-iCMs were compared with control iCMs were enriched in extracellular matrix and the plasma membrane maintenance pathways. Potentially relevant genes include *GDF15*, *HMOX1*, and *HSPG2*, which were upregulated in FRDA iCMs. *GDF15* encodes a secreted ligand of TGF-beta (also known as Macrophage inhibitory cytokine-1). Several studies have associated *GDF15* and cardiac fibrosis. In addition to this, *GDF15* also increases in response to cellular and mitochondrial dysfunction. It acts as an inflammatory marker and is a player in the

pathogenesis of cardiovascular diseases, metabolic disorders, and neurodegenerative processes (Foley et al., 2009; Kempf & Wollert, 2009; Rochette et al., 2021; Yatsuga et al., 2015). This correlation suggests that *GDF15* may have potential as a serum biomarker for FRDA-associated heart disease (Kempf et al., 2007).

*HMOX1* encodes for the heme oxygenase 1 enzyme, which mediates the first step of heme catabolism. *HMOX* upregulation has been implicated in increased ferroptosis in diabetic atherosclerosis (Meng et al., 2021). Frataxin is involved in iron regulation and heme synthesis with ferroptosis as a newly proposed mechanism in FRDA (Turchi et al., 2020), and 10%–30% of FRDA patients develop diabetes (Cnop et al., 2012; Gucev et al., 2009). *HSPG2* gene encodes for perlecan, a heparin sulfate proteoglycan found in the extracellular matrix. Perlecan has been implicated in various pathologies associated with extracellular matrix remodeling, including diabetes, cardiovascular disease, and Alzheimer's disease (Martinez et al., 2018). The IPA shows how these genes are connected in a signaling network to other differentially expressed genes in the IPA knowledge base (Figure 7c). This illustrates the possibilities of frataxin interactions in cardiomyocytes involved in remodeling the extracellular matrix in FRDA.

When comparing the differentially expressed genes of FRDA iPSC-derived iCMs from this study with another study in iCMs derived from an FRDA patient (Li et al., 2019), we found that the shared dysregulated genes belong to processes related to the extracellular matrix. Some of the processes are supramolecular collagen fibril organization, collagen fibril organization, extracellular space, and extracellular matrix (Table S4). This further supports the evidence that extracellular matrix remodeling plays a role in developing cardiac disease in FRDA and that frataxin dysregulation is involved in this process.

The goal of our study was to directly evaluate the role of the frataxin-deficiency independent of the GAA expansion or effects of drugs. By doing this, we identified key interactions of a frataxin network that may contribute to FRDA pathogenesis. Genes involved in glycolysis seem to have an essential role in the neurological aspect of FRDA, whereas genes related to the extracellular matrix are fundamental for the development of cardiac disease. This difference between iNs and iCMs may offer insights into unique effects and susceptibilities of the neuros and the heart in FRDA. The heart and neurons differ significantly in their energy sources and susceptibility to nutrient deprivation. In the healthy human heart >95% of the ATP is produced from oxidative phosphorylation in the mitochondria. The preferred substrates are fatty acids accounting for 70%–90% of ATP. Approximately 10%–25% of myocardia ATP comes from oxidation of glucose, lactate, amino acids, and ketone bodies. Glycolysis and

the citric acid cycle account for about 5% of myocardial ATP (Stanley et al., 2005; Taegtmeyer, 1994). Most cardiac disease states (e.g., ischemia, heart failure, hypertrophy) exhibit reduced myocardial energy production with a shift away from fatty acids-oxidation towards more glucose-dependence (Neubauer, 2007). Central neurons rely almost exclusively on glycolysis with full oxidation of glycolytic products by oxidative phosphorylation in the mitochondria (Dalsgaard, 2006; Yellen, 2018). Thus, the perturbation of glycolytic pathway gene expression in FRDA neurons may explain why the earliest manifestation of the disease is usually neurological while cardiac pathology is later and more variable.

#### 4.1 | Limitations of this study

It is interesting to observe that few genes and pathways overlap when comparing this study to other RNA-seq studies in FRDA-relevant cells. This could reflect the different techniques used to generate iNs and iCMs, to up-regulate frataxin, the patient-to-patient variability, as well as our study limitations. We did not use an isogenic cell line as a control, and the results are from one patient. Therefore, the generation of isogenic cell lines and studies with multiple patients is vital in resolving which genes are truly associated with the disease. We also did not observe any physiologically relevant phenotype in the FRDA cells. Therefore, the ability to mature the iPSC-derived cells to generate phenotypes that could be corrected with frataxin replacement will be critical in obtaining the complete picture of how FRDA develops.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Project conception and design (TVM, MBA), recruitment of FRDA subjects (TZ, AP), clinical phenotyping (TZ, AP), acquisition of data (MBA, AB, JY), analysis and interpretation of data (MBA, AB, MAA, TVM), and writing and editing of manuscript (MBA, AB, JY, MAA, TZ, AP, TVM).

#### ACKNOWLEDGMENTS


We thank the patient for donating his blood sample for this research.

#### FUNDING INFORMATION

This work was supported by the USF-Preeminence Fund.

#### ORCID

Mariana B. Angulo  <https://orcid.org/0000-0002-1982-8102>

Thomas V. McDonald  <https://orcid.org/0000-0002-6075-0888>

#### REFERENCES

- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L. M., Gacy, A. M., & Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: Implications for Friedreich ataxia. *American Journal of Human Genetics*, 67(3), 549–562. <https://doi.org/10.1086/303056>
- Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., Bonomi, F., & Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(4), 390–396. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1579>
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., Trabzuni, D., & Pook, M. (2008). The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Human Molecular Genetics*, 17(5), 735–746. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm346>
- Angulo, M. B., Yang, J., Argenziano, M. A., Bertalovitz, A. C., Beidokhti, M. N., & McDonald, T. V. (2021). Generation of a Friedreich's ataxia patient-derived iPSC line USFi001-a. *Stem Cell Research*, 54, 102399. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102399>
- Aranca, T. V., Jones, T. M., Shaw, J. D., Staffetti, J. S., Ashizawa, T., Kuo, S. H., Fogel, B. L., Wilmot, G. R., Perlman, S. L., Onyike, C. U., Ying, S. H., & Zesiewicz, T. A. (2016). Emerging therapies in Friedreich's ataxia. *Neurodegenerative Disease Management*, 6(1), 49–65. <https://doi.org/10.2217/nmt.15.73>
- Becker, E. M., Greer, J. M., Ponka, P., & Richardson, D. R. (2002). Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in friend cells: Characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood*, 99(10), 3813–3822. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.10.3813>
- Belbellaa, B., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Monassier, L., & Puccio, H. (2020). High levels of Frataxin overexpression Lead to mitochondrial and cardiac toxicity in mouse models. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 19, 120–138. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.018>
- Bolnches-Amoros, A., Molla, B., Pla-Martin, D., Palau, F., & Gonzalez-Cabo, P. (2014). Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 124. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00124>
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S. J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F. J., Dürr, A., Mandel, J. L., Vescovi, A., Pandolfo, M., & Koenig, M. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1771–1780. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1771>
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., & Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271(5254), 1423–1427. <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423>
- Castaldo, I., Pinelli, M., Monticelli, A., Acquaviva, F., Giacchetti, M., Filla, A., Sacchetti, S., Keller, S., Avvedimento, V. E.,



- Chiariotti, L., & Coccozza, S. (2008). DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *Journal of Medical Genetics*, 45(12), 808–812. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.058594>
- Chandran, V., Gao, K., Swarup, V., Versano, R., Dong, H., Jordan, M. C., & Geschwind, D. H. (2017). Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's ataxia. *eLife*, 6, e30054. <https://doi.org/10.7554/eLife.30054>
- Chiara, F., Castellaro, D., Marin, O., Petronilli, V., Brusilow, W. S., Juhaszova, M., Sollott, S. J., Forte, M., Bernardi, P., & Rasola, A. (2008). Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One*, 3(3), e1852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001852>
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., Musuaya, A. E., Marhfour, I., Ladrière, L., Moles Lopez, X., Lefkaditis, D., Moore, F., Brion, J.-P., Cooper, J. M., Schapira, A. H. V., Clark, A., Koeppen, A. H., Marchetti, P., Pandolfo, M., ... Fery, F. (2012). Central role and mechanisms of beta-cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Annals of Neurology*, 72(6), 971–982. <https://doi.org/10.1002/ana.23698>
- Codazzi, F., Hu, A., Rai, M., Donatello, S., Salerno Scarzella, F., Mangiameli, E., Pelizzoni, I., Grohovaz, F., & Pandolfo, M. (2016). Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Human Molecular Genetics*, 25(22), 4847–4855. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw308>
- Cook, A., & Giunti, P. (2017). Friedreich's ataxia: Clinical features, pathogenesis and management. *British Medical Bulletin*, 124(1), 19–30. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx034>
- Cossee, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J. L., & Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7452–7457. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7452>
- Dalsgaard, M. K. (2006). Fuelling cerebral activity in exercising man. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(6), 731–750. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600256>
- De Biase, I., Rasmussen, A., Monticelli, A., Al-Mahdawi, S., Pook, M., Coccozza, S., & Bidichandani, S. I. (2007). Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics*, 90(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.04.001>
- Delatycki, M. B., & Bidichandani, S. I. (2019). Friedreich ataxia-pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiology of Disease*, 132, 104606. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104606>
- Delatycki, M. B., Williamson, R., & Forrest, S. M. (2000). Friedreich ataxia: An overview. *Journal of Medical Genetics*, 37(1), 1–8. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.1.1>
- Didiasova, M., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2019). When place matters: Shuttling of Enolase-1 across cellular compartments. *Frontiers in Cell and Development Biology*, 7, 61. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00061>
- Faik, P., Walker, J. I., Redmill, A. A., & Morgan, M. J. (1988). Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature*, 332(6163), 455–457. <https://doi.org/10.1038/332455a0>
- Finocchiaro, G., Baio, G., Micossi, P., Pozza, G., & di Donato, S. (1988). Glucose metabolism alterations in Friedreich's ataxia. *Neurology*, 38(8), 1292–1296. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.8.1292>
- Foley, P. W., Stegemann, B., Ng, K., Ramachandran, S., Proudler, A., Frenneaux, M. P., Ng, L. L., & Leyva, F. (2009). Growth differentiation factor-15 predicts mortality and morbidity after cardiac resynchronization therapy. *European Heart Journal*, 30(22), 2749–2757. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp300>
- Gucev, Z., Tasic, V., Jancevska, A., Popjordanova, N., Koceva, S., Kuturec, M., & Sabolic, V. (2009). Friedreich ataxia (FA) associated with diabetes mellitus type 1 and hyperthrophic cardiomyopathy. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 9(2), 107–110. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2009.2828>
- Gunal, N., Saraclar, M., Ozkutlu, S., Senocak, F., Topaloglu, H., & Karaaslan, S. (1996). Heart disease in Friedreich's ataxia: A clinical and echocardiographic study. *Acta Paediatrica Japonica*, 38(4), 308–311. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200x.1996.tb03496.x>
- Hanson, E., Sheldon, M., Pacheco, B., Alkubeysi, M., & Raizada, V. (2019). Heart disease in Friedreich's ataxia. *World Journal of Cardiology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.4330/wjc.v11.i1.1>
- Harding, A. E., & Hewer, R. L. (1983). The heart disease of Friedreich's ataxia: A clinical and electrocardiographic study of 115 patients, with an analysis of serial electrocardiographic changes in 30 cases. *The Quarterly Journal of Medicine*, 52(208), 489–502. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6228949>
- Heidari, M. M., Houshmand, M., Hosseinkhani, S., Nafissi, S., & Khatami, M. (2009). Complex I and ATP content deficiency in lymphocytes from Friedreich's ataxia. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 36(1), 26–31. <https://doi.org/10.1017/s0317167100006260>
- Hick, A., Wattenhofer-Donze, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J. P., Vaucamps, N., Gall, D., Lambot, L., André, C., Reutenauer, L., Rai, M., Teletin, M., Messaddeq, N., Schiffmann, S. N., Viville, S., Pearson, C. E., Pandolfo, M., & Puccio, H. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Disease Models & Mechanisms*, 6(3), 608–621. <https://doi.org/10.1242/dmm.010900>
- Huichalaf, C., Perfitt, T. L., Kuperman, A., Gooch, R., Kovi, R. C., Brenneman, K. A., Chen, X., Hirehallur-Shanthappa, D., Ma, T., Assaf, B. T., Pardo, I., Franks, T., Monarski, L., Cheng, T.-W., Le, K., Su, C., Somanathan, S., Whiteley, L. O., Bulawa, C., ... Martelli, A. (2022). In vivo overexpression of frataxin causes toxicity mediated by iron-sulfur cluster deficiency. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 24, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.02.002>
- Isaacs, C. J., Brigatti, K. W., Kucheruk, O., Ratcliffe, S., Sciascia, T., McCormack, S. E., Willi, S. M., & Lynch, D. R. (2016). Effects of genetic severity on glucose homeostasis in Friedreich ataxia. *Muscle & Nerve*, 54(5), 887–894. <https://doi.org/10.1002/mus.25136>
- Kawai, C., Kato, S., Takashima, M., Fujiwara, H., & Haebara, H. (2000). Heart disease in Friedreich's ataxia: Observation of a case for half a century. *Japanese Circulation Journal*, 64(3), 229–236. <https://doi.org/10.1253/jcj.64.229>
- Keita, M., McIntyre, K., Rodden, L. N., Schadt, K., & Lynch, D. R. (2022). Friedreich ataxia: Clinical features and new developments. *Neurodegenerative Disease Management*, 12, 267–283. <https://doi.org/10.2217/nmt-2022-0011>
- Kempf, T., von Haehling, S., Peter, T., Allhoff, T., Cicoira, M., Doehner, W., Ponikowski, P., Filippatos, G. S., Rozenrtyt, P., Drexler,

- H., Anker, S. D., & Wollert, K. C. (2007). Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(11), 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.04.091>
- Kempf, T., & Wollert, K. C. (2009). Growth-differentiation factor-15 in heart failure. *Heart Failure Clinics*, 5(4), 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2009.04.006>
- Koepfen, A. H., & Mazurkiewicz, J. E. (2013). Friedreich ataxia: Neuropathology revised. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(2), 78–90. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31827e5762>
- Koepfen, A. H., Ramirez, R. L., Becker, A. B., Bjork, S. T., Levi, S., Santambrogio, P., Parsons, P. J., Kruger, P. C., Yang, K. X., Feustel, P. J., & Mazurkiewicz, J. E. (2015). The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia. *PLoS One*, 10(3), e0116396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116396>
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O., & Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nature Genetics*, 16(4), 345–351. <https://doi.org/10.1038/ng0897-345>
- Lai, J. I., Nachun, D., Petrosyan, L., Throesch, B., Campau, E., Gao, F., Baldwin, K. K., Coppola, G., Gottesfeld, J. M., & Soragni, E. (2019). Transcriptional profiling of isogenic Friedreich ataxia neurons and effect of an HDAC inhibitor on disease signatures. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(6), 1846–1859. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006515>
- Lee, Y. K., Lau, Y. M., Ng, K. M., Lai, W. H., Ho, S. L., Tse, H. F., Siu, C. W., & Ho, P. W. (2016). Efficient attenuation of Friedreich's ataxia (FRDA) cardiomyopathy by modulation of iron homeostasis-human induced pluripotent stem cell (hiPSC) as a drug screening platform for FRDA. *International Journal of Cardiology*, 203, 964–971. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.101>
- Li, J., Rozwadowska, N., Clark, A., Fil, D., Napierala, J. S., & Napierala, M. (2019). Excision of the expanded GAA repeats corrects cardiomyopathy phenotypes of iPSC-derived Friedreich's ataxia cardiomyocytes. *Stem Cell Research*, 40, 101529. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101529>
- Li, Y., Polak, U., Bhalla, A. D., Rozwadowska, N., Butler, J. S., Lynch, D. R., Dent, S. Y., & Napierala, M. (2015). Excision of expanded GAA repeats alleviates the molecular phenotype of Friedreich's ataxia. *Molecular Therapy*, 23(6), 1055–1065. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.41>
- Lim, F., Palomo, G. M., Mauritz, C., Gimenez-Cassina, A., Illana, B., Wandosell, F., & Diaz-Nido, J. (2007). Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector. *Molecular Therapy*, 15(6), 1072–1078. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300143>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C[T]) method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lodi, R., Cooper, J. M., Bradley, J. L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D. J., & Schapira, A. H. (1999). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11492–11495. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11492>
- Long, A., Napierala, J. S., Polak, U., Hauser, L., Koepfen, A. H., Lynch, D. R., & Napierala, M. (2017). Somatic instability of the expanded GAA repeats in Friedreich's ataxia. *PLoS One*, 12(12), e0189990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189990>
- Martinez, J. R., Dhawan, A., & Farach-Carson, M. C. (2018). Modular proteoglycan Perlecan/HSPG2: Mutations, phenotypes, and functions. *Genes (Basel)*, 9(11), 556. <https://doi.org/10.3390/genes9110556>
- Meng, Z., Liang, H., Zhao, J., Gao, J., Liu, C., Ma, X., Liu, J., Liang, B., Jiao, X., Cao, J., & Wang, Y. (2021). HMOX1 upregulation promotes ferroptosis in diabetic atherosclerosis. *Life Sciences*, 284, 119935. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119935>
- Neubauer, S. (2007). The failing heart—An engine out of fuel. *The New England Journal of Medicine*, 356(11), 1140–1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Orosz, F., Olah, J., & Ovadi, J. (2006). Triosephosphate isomerase deficiency: Facts and doubts. *IUBMB Life*, 58(12), 703–715. <https://doi.org/10.1080/15216540601115960>
- Pousset, F., Legrand, L., Monin, M. L., Ewencyk, C., Charles, P., Komajda, M., Brice, A., Pandolfo, M., Isnard, R., du Montcel, S. T., & Durr, A. (2015). A 22-year follow-up study of Long-term cardiac outcome and predictors of survival in Friedreich ataxia. *JAMA Neurology*, 72(11), 1334–1341. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1855>
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., & Lahn, B. T. (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*, 5(5), e10611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Rochette, L., Dogon, G., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2021). GDF15 and cardiac cells: Current concepts and new insights. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8889. <https://doi.org/10.3390/ijms22168889>
- Romagnoli, A., Oliverio, S., Evangelisti, C., Iannicola, C., Ippolito, G., & Piacentini, M. (2003). Neuroleukin inhibition sensitises neuronal cells to caspase-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(3), 448–453. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00188-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00188-8)
- Sacca, F., Puorro, G., Antenora, A., Marsili, A., Denaro, A., Piro, R., Sorrentino, P., Pane, C., Tessa, A., Brescia Morra, V., Coccozza, S., De Michele, G., Santorelli, F. M., & Filla, A. (2011). A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: Implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS One*, 6(3), e17627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017627>
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Taegtmeier, H. (1994). Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications. *Current Problems in Cardiology*, 19(2), 59–113. [https://doi.org/10.1016/0146-2806\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0146-2806(94)90008-6)
- Turchi, R., Faraonio, R., Lettieri-Barbato, D., & Aquilano, K. (2020). An overview of the Ferroptosis hallmarks in Friedreich's ataxia. *Biomolecules*, 10(11), 1489. <https://doi.org/10.3390/biom10111489>
- Vannocci, T., Notario Manzano, R., Beccalli, O., Bettegazzi, B., Grohovaz, F., Cinque, G., De Riso, A., Quaroni, L., Codazzi, F., & Pastore, A. (2018). Adding a temporal dimension to the study of Friedreich's ataxia: The effect of frataxin overexpression in a human cell model. *Disease Models & Mechanisms*, 11(6), dmm032706. <https://doi.org/10.1242/dmm.032706>

- Worth, A. J., Basu, S. S., Deutsch, E. C., Hwang, W. T., Snyder, N. W., Lynch, D. R., & Blair, I. A. (2015). Stable isotopes and LC-MS for monitoring metabolic disturbances in Friedreich's ataxia platelets. *Bioanalysis*, 7(15), 1843–1855. <https://doi.org/10.4155/bio.15.118>
- Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., & Koga, Y. (2015). Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Annals of Neurology*, 78(5), 814–823. <https://doi.org/10.1002/ana.24506>
- Yellen, G. (2018). Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *The Journal of Cell Biology*, 217(7), 2235–2246. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803152>
- Yoon, T., & Cowan, J. A. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 125(20), 6078–6084. <https://doi.org/10.1021/ja027967i>
- Yoon, T., & Cowan, J. A. (2004). Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25943–25946. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400107200>
- Zesiewicz, T. A., Hancock, J., Ghanekar, S. D., Kuo, S. H., Dohse, C. A., & Vega, J. (2020). Emerging therapies in Friedreich's ataxia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 20(12), 1215–1228. <https://doi.org/10.1080/14737175.2020.1821654>
- Zhang, M., Cheng, X., Dang, R., Zhang, W., Zhang, J., & Yao, Z. (2018). Lactate deficit in an Alzheimer disease mouse model: The relationship with neuronal damage. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 77(12), 1163–1176. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly102>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Angulo, M. B., Bertalovitz, A., Argenziano, M. A., Yang, J., Patel, A., Zesiewicz, T., & McDonald, T. V. (2023). Frataxin deficiency alters gene expression in Friedreich ataxia derived iPSC-neurons and cardiomyocytes. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 11, e2093. <https://doi.org/10.1002/mgg3.2093>